

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv různých derivátů cytokininů na produkci etylenu v oddělených listech

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Lucie Cmajdálková**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Zuzana Kučerová**
Rok: : 2019

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím vyznačených pramenů a literatury, pod vedením Mgr. Zuzany Kučerové.

V Olomouci dne Podpis.....

Za veškerou pomoc, nekonečnou trpělivost a cenné rady při realizaci bakalářské práce děkuji Mgr. Zuzaně Kučerové. Dále děkuji Ing. Jaromíru Mikulíkovi, Ph.D. za provedení plynové chromatografie pro stanovení obsahu etylenu. V neposlední řadě děkuji univerzitnímu grantu IGA_PrF_2018_022 za finanční podporu. Svým rodičům, prarodičům a příteli děkuji za velkou podporu a pomoc při studiu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Cmajdálková
Název práce	Vliv různých derivátů cytokininů na produkci etylenu v oddělených listech
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Kučerová
Rok obhajoby práce	2019
Klíčová slova	Cytokininy, etylen, senescence, pšenice, Arabidopsis, chlorofyl, fluorescence, F_v/F_m
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lucie Cmajdálková
Title of the thesis	Effect of different cytokinin derivatives on ethylene production in detached leaves
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Zuzana Kučerová
The year of presentation	2019
Key words	Cytokinins, ethylene, senescence, wheat, Arabidopsis, chlorophyll, fluorescence, F_v/F_m
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstrakt

Senescence je přirozený proces probíhající ve všech rostlinách. Je řízena genetickým programem rostliny, její iniciaci a průběh však ovlivňuje řada vnitřních a vnějších faktorů. Cytokininy jsou fytohormony, které při zvýšení jejich endogenního obsahu nebo exogenní aplikaci na rostliny či oddělené listy senescenci oddalují, zároveň však stimulují produkci etylenu, který senescenci podporuje. V této práci byl sledován vliv 6-benzylaminopurinu (BAP) a nově připravených cytokininových derivátů odvozených od BAP označených jako 3OHBAPA a 3MeOBAPA na průběh indukované senescence a produkci etylenu v oddělených listových segmentech pšenice a oddělených listech *Arabidopsis*. Listy a listové segmenty byly uzavřeny do skleněných vialek a inkubovány ve tmě v roztocích BAP a jeho derivátů o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ po dobu šesti dní po oddělení u pšenice a šest, čtyři nebo pět dní u *Arabidopsis*. Míra potlačení senescence byla poté posuzována na základě měření obsahu chlorofylů *a+b* a karotenoidů a měření parametru F_v/F_m . Zároveň byla pomocí plynové chromatografie stanovována produkce etylenu oddělenými listy a listovými segmenty. V oddálení senescence u pšenice byl nejúčinnější derivát 3OHBAPA, kdy po aplikaci tohoto derivátu došlo k největšímu zpomalení změn sledovaných parametrů a zároveň byla zaznamenána nejnižší produkce etylenu listovými segmenty. V případě oddělených listů *Arabidopsis* byl ve zpomalení poklesu obsahu chlorofylu mírně účinnější BAP, ale v zachování funkce fotosyntetického aparátu pak 3MeOBAPA. Produkce etylenu oddělenými listy byla po pětidenní inkubaci v BAP velmi výrazně vyšší oproti ostatním použitým látkám, u nichž byla vzájemně srovnatelná.

Summary

Senescence is a natural process that occurs in all plant organisms. It is controlled by genetic program of the plant, but its initiation and process is influenced by a number of internal and external factors. Cytokinins are phytohormones that can delay senescence by increasing their endogenous content or exogenous application on plants or detached leaves, but at the same time they have a positive effect on the production of ethylene, which supports senescence. In this work, the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) and two novel BAP derivatives 3OHBAPA and 3MeOBAPA on progression of induced senescence and production of ethylene in detached wheat leaf segments and Arabidopsis leaves was investigated. Detached leaf segments and leaves were sealed in glass vials and incubated in BAP and its derivatives at a concentration 10^{-5} mol.l⁻¹ in the dark for six days after detachment in the case of wheat and for six, four or five days in the case of Arabidopsis. The effect of BAP and its derivatives on induced senescence was assessed by measuring the content of chlorophyll *a+b* and carotenoids and F_v/F_m . Ethylene production by detached leaves and leaf segments was also determined. In the delay of senescence in wheat, the most effective derivative was 3OHBAPA, where the most significant slowing of senescence-induced changes was observed, while the lowest ethylene production was measured. In detached Arabidopsis leaves, BAP was slightly more effective in the chlorophyll retention, but 3MeOBAPA more effectively maintained the function of the photosynthetic apparatus. The production of ethylene was significantly higher after five-day incubation in BAP in comparison with other substances.

Obsah

1	Úvod	10
2	Současný stav řešené problematiky	11
2.1	Senescence.....	11
2.2	Rostlinné hormony	14
2.3	Cytokininy	17
2.3.1	Rozdělení a struktura cytokininů	17
2.3.2	Vliv cytokininů na senescenci.....	18
2.3.3	Vliv cytokininových derivátů na senescenci.....	20
2.4	Etylen.....	22
2.5	Působení cytokininů a etylenu na senescenci	23
3	Experimentální část	26
3.1	Materiál a metody.....	26
3.1.1	Rostlinný materiál	26
3.1.2	Použité metody.....	27
3.1.2.1	Měření obsahu chlorofylu.....	27
3.1.2.2	Měření parametrů chlorofylové fluorescence	28
3.1.2.3	Stanovení produkce etylenu.....	28
3.1.2.4	Extrakce a analytické stanovení pigmentů.....	28
4	Výsledky	30
4.1	Obsah chlorofylů <i>a+b</i>	31
4.2	Obsah karotenoidů.....	35
4.3	F_v/F_m	38
4.4	Obsah etylenu	42
5	Diskuze	46
6	Závěr	49
7	Literatura	50
8	Seznam použitých zkratk	57

Cíle práce

- 1 Vypracovat přehled problematiky o vlivu cytokininů a etylenu na senescenci rostlin, jejich vzájemném působení a změnách jejich obsahu, resp. produkce během senescence.
- 2 Zvládnout metodiky pěstování a navození indukované senescence listů modelových rostlin (pšenice, Arabidopsis) a přípravy rostlinných vzorků pro stanovení produkce etylenu.
- 3 Zvládnout metodiku stanovení obsahu chlorofylu analyticky a pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica, Minolta, Japonsko) a měření parametru F_v/F_m v ploše listu pomocí přístroje FluorCam (PSI, Brno, ČR) včetně zpracování dat. Provést tato měření u oddělených listů modelových rostlin během indukované senescence pod vlivem různých derivátů cytokininů.
- 4 Zpracovat výsledky experimentů a zhodnotit vliv různých derivátů cytokininů na produkci etylenu v souvislosti se změnami obsahu chlorofylu a funkce fotosystému II během indukované senescence.

1 Úvod

Senescence je poslední fází vývoje rostlin. Jedná se o přirozený proces, který je řízen genetickým programem rostliny. Senescenci je také možné indukovat, a to např. změnou environmentálních podmínek (tma, vysoké nebo nízké teploty). Senescence je spojena s řadou strukturních a metabolických změn, dochází při ní k degradaci mnohých molekul, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny či membránové lipidy. V průběhu senescence postupně klesá rychlost fotosyntézy a dochází k degradaci chloroplastů. Kromě těch jsou degradovány i další organely, mezi posledními pak buněčná jádra a mitochondrie. Senescenci pozorujeme zejména jako žloutnutí listů, jakožto výsledek rozkladu pigmentů. Nástup a průběh senescence do velké míry ovlivňují také fytohormony, například cytokininy, které hrají nezastupitelnou roli i v celé řadě dalších procesů probíhajících v rostlinách. Cytokininy se účastní buněčného dělení, procesů klíčení a vývoje orgánů, formování stonkového meristému a mnoha dalších. Zvýšením jejich endogenního obsahu nebo exogenní aplikací na rostliny i oddělené listy lze úspěšně oddálit senescenci. Cytokininy zpomalují změny, ke kterým při senescenci dochází, např. pomáhají udržovat funkci fotosyntetického aparátu či zabraňují rychlé degradaci pigmentů. Některé cytokininy stimulují produkci fytohormonu etylenu.

Etylen je zapojen do mnoha dějů probíhajících v rostlinách. Kromě jeho vlivu na klíčení semen, kvetení a zrání plodů také podporuje změny, ke kterým v rostlinném organismu dochází v průběhu senescence. Etylen však senescenci přímo nespouští, pouze ovlivňuje její průběh. Účinek etylenu na rychlost senescence se zvyšuje s rostoucím stářím rostliny. Je známo, že cytokininy podporují produkci etylenu v rostlinách i oddělených listech a zároveň neztrácí svůj antisenesescenční účinek.

V této práci byl použit cytokinin 6-benzylaminopurin (BAP) a dva od něj odvozené nově připravené deriváty s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA za účelem zhodnocení vlivu těchto sloučenin na průběh senescence u oddělených listů *Arabidopsis* (*A. thaliana* L. ekotyp Columbia 0) a listových segmentů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka). Cílem bylo také zjistit, jak tyto sloučeniny ovlivňují produkci etylenu. Míra indukované senescence byla stanovována pomocí maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) a obsahu fotosyntetických pigmentů, a to v souvislosti s produkcí etylenu oddělenými listy a listovými segmenty modelových rostlin.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Senescence

Senescence je konečným vývojovým stádiem životního cyklu rostliny (Clausen a Apel, 1991). Stárnutí rostlin, ukončení růstu buněk, orgánů i celé rostliny je vysoce regulovaný a koordinovaný proces, který iniciují a ovlivňují vnější i vnitřní faktory (Lim *et al.*, 2007; Guo a Gan, 2012; Li *et al.*, 2017). Vnější, též environmentální faktory zahrnují dostupnost vody, množství živin, nízké či vysoké teploty, mechanické poškození nebo infekci patogeny. Mezi vnitřní faktory pak patří mimo jiné obsah fytohormonů, stáří rostliny nebo její fyziologický stav. Senescenci je možné rozdělit na listovou, senescenci květů a plodů a také senescenci posklizňovou. V rámci této práce byla pozornost věnována senescenci listové. Senescence listů je jedním z nejvíce studovaných procesů v rostlinách, jelikož má stárnutí listů i celých rostlin velmi výrazný dopad na zemědělství, kdy jsou ovlivňovány především výnosy a trvanlivost listové zeleniny (Noodén *et al.*, 1997; Quirino *et al.*, 2000). Během senescence dochází k vysoce koordinovaným změnám ve struktuře buněk, metabolismu a expresi genů. Jednou z nejvýznamnějších strukturních změn je rozpad chloroplastů, které obsahují až 70 % z celkového obsahu proteinů v listech (Gan a Amasino, 1997). Změny ve struktuře chloroplastů během indukované senescence studovali např. Špundová *et al.* (2003). Oddělené segmenty primárních listů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent) byly vloženy do misek s destilovanou vodou a poté uchovávány ve tmě nebo při světle (kontinuální PAR, intenzita $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) po dobu 5 dní. Měření obsahu chlorofylů *a+b* probíhalo 3., 4. a 5. den po oddělení. Pozorován byl také nárůst lipidové peroxidace a prostřednictvím transmisní elektronové mikroskopie (TEM) také struktura chloroplastů. Obsah chlorofylů *a+b* v listových segmentech uchovávaných ve tmě klesal s přibývajícím dnem po oddělení, přičemž poměr obsahu chlorofylu *a* a *b* nebyl příliš rozdílný. Struktura tylakoidů v chloroplastech (včetně uspořádání gran) byla relativně konstantní až do čtvrtého dne po oddělení, pátý den po oddělení byla pozorována dezintegrace gran zhruba u čtvrtiny všech chloroplastů (Špundová *et al.*, 2003).

S nástupem senescence klesá rychlost fotosyntézy. V *in vitro* experimentech, ve kterých byly pozorovány izolované chloroplasty nebo tylakoidní membrány senescenčních listů, bylo prokázáno, že v důsledku senescence dochází k poklesu fotochemické aktivity fotosystémů I a II (PSI, PSII) (Grover a Mohanty, 1992). Pokles

aktivity PSII lze sledovat např. jako pokles parametru F_v/F_m , což je jeden z nejčastěji používaných parametrů pro stanovení fluorescence chlorofylu. Fluorescence chlorofylu je využívána zejména ke studiu regulačních procesů ovlivňujících funkci PSII. Vzhledem k tomu, že de-excitační procesy (fotochemie, fluorescence chlorofylu *a* a tepelná disipace), ke kterým dochází po přijetí energie fotonů anténním systémem PSII, jsou vzájemně nepřímo úměrné, je měření chlorofylové fluorescence využíváno jako jednoduchý, neinvazivní a účinný nástroj pro studium fotosyntetické aktivity. S vyšším zastoupením fluorescence chlorofylu klesá fotochemická a/nebo tepelně disipační de-excitace absorbované energie. Chlorofylová fluorescence je často využívána pro hodnocení fyziologického stavu rostlin při působení nejrůznějších stresových faktorů. Parametr chlorofylové fluorescence F_v/F_m je definován jako podíl variabilní (F_v) a maximální (F_m) fluorescence. Variabilní fluorescenci rozumíme hodnotu okamžité fluorescence zmenšenou o základní fluorescenci (F_0). Snížení F_v/F_m obecně indikuje poškození nebo snížení funkce reakčních center fotosystému II. Tento parametr je tedy redukován zejména u stresovaných rostlin nebo při senescenci (Roháček a Barták, 1999; Roháček, 2002; Špundová *et al.*, 2003; Vlčková *et al.*, 2006; Prokopová *et al.*, 2010; Kalaji *et al.*, 2017).

Při senescenci dochází také ke katabolismu chlorofylu a makromolekul jako jsou proteiny, membránové lipidy a RNA. V důsledku degradace pigmentů dochází při senescenci ke změně barvy listu, zejména pak k jeho žloutnutí (Noodén *et al.*, 1997; Ougham *et al.*, 2005). Kromě chlorofylu, jehož degradace je v průběhu senescence nejvýraznější, jsou degradovány i karotenoidy, mezi které se řadí xantofyly a karoteny (Biswal, 1995). Zatímco k rozkladu chloroplastů dochází relativně brzy po nástupu senescence, mitochondrie a jádra zůstávají nedotčena až do jejich pozdních stádií, a to z důvodu řízení celé senescence včetně recyklačních procesů a také zajištění energie pro tyto pochody. Součástí recyklačních drah je transport dusíku, uhlíku a minerálů do jiných částí rostliny, kde mohou být tyto složky dále efektivně využity (Gan a Amasino, 1997). Hydrolyzované molekuly jsou transportovány do vyvíjejících se semen jednoletých rostlin, nebo do dalších listů, pupenů, stonků anebo kořenů víceletých rostlin (Munné-Bosch, 2008). Součástí změn, ke kterým v senescenčních rostlinách dochází, je nárůst reaktivních forem kyslíku (např. Thompson a Lake, 1987; Leshem, 1988; Rosenwasser *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012), a lipidové peroxidace, na kterém se mimo jiné podílí klesající aktivita antioxidantních enzymů katalasy a superoxidodismutasy, a deteriorace cytoplazmatické membrány (Dhindsa *et al.*, 1981;

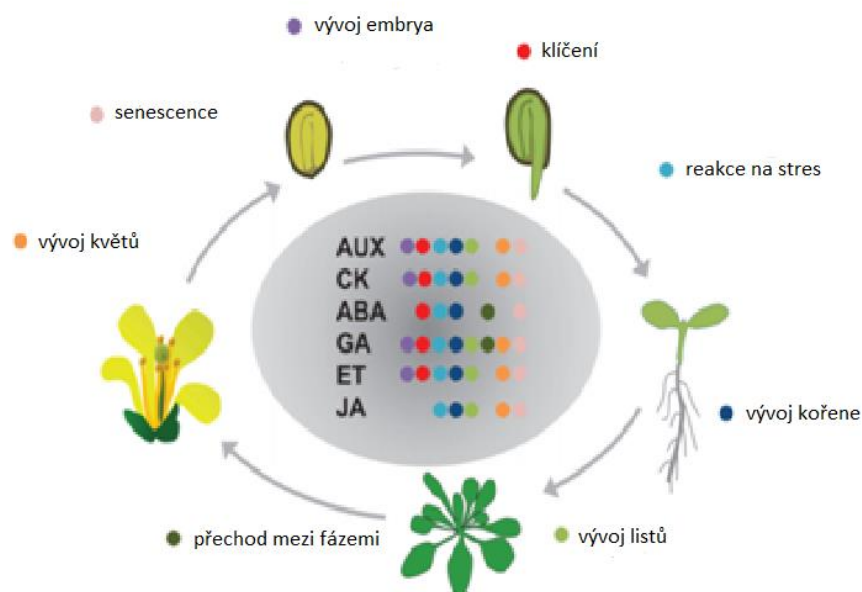
Špundová *et al.*, 2003; Zimmermann a Zentgraf, 2005). Zejména díky recyklačním procesům je listová senescence považována za jeden z typů programované buněčné smrti (PCD). PCD je obecný a relativně široký termín, který vyjadřuje vlastnost buněk podporovat svou vlastní smrt prostřednictvím aktivace systémů sebezničení. Kromě senescence se PCD vyskytuje i v jiných vývojových stádiích rostlin včetně embryogeneze a také při hypersenzitivní reakci na infekci patogeny (např. Gan a Amasino, 1997).

Rychlost senescence je u jednotlivých druhů rostlin odlišná. Příkladem rostliny s rychlým nástupem senescence listu je *Arabidopsis* (*A. thaliana* L.). Při pěstování rostlin *Arabidopsis* při kontinuálním osvětlení dochází po dosažení maximální velikosti listů k poklesu fotosyntetické kapacity o 50 % už mezi čtvrtým a šestým dnem (Hensel *et al.*, 1993). Velmi pomalá senescence je charakteristická např. pro borovici dlouhověkou (*Pinus longaeva* D.K. Bailey), u které předpokládaná životnost jehlic činí 45 let (Ewers a Schmid, 1981).

Významnou roli při senescenci hrají geny označované jako SAG (*senescence-associated genes*). Jedná se o geny, jejichž exprese se výrazněji zvyšuje až v průběhu senescence (Nam, 1997). Tyto geny kódují zejména degradační enzymy, jako jsou RNasy (Taylor *et al.*, 1993), proteiny (Hensel *et al.*, 1993; Lohman *et al.*, 1994; Drake *et al.*, 1996) lipasy (Ryu a Wang, 1995) a také geny, jejichž produkty jsou zapojeny do transportu živin (Watanabe *et al.*, 1994). Některé SAG jsou natolik specifické pro senescenci, že jsou považovány za senescenční *markery*. Patří mezi ně SAG12, který byl izolován z *Arabidopsis* (Gan a Amasino, 1995). Senescence listů je doprovázena změnami v genové expresi v celém genomu. Klíčovým mechanismem, který řídí na stáří závislou ale i indukovanou expresi SAG genů, je dynamická aktivace transkripčních faktorů. Hlavními skupinami transkripčních faktorů, které regulují senescenci, jsou NAC a WRKY. Mezi NAC patří např. NAM, ATAF1,2 nebo CUC2. Jsou specifické pro rostliny a kromě senescence ovlivňují i další procesy, jako je tvorba sekundární buněčné stěny či reakce na biotické i abiotické stresy. Genomické analýzy transkriptomů prokázaly, že více než 30 genů NAC je výrazně nadexprimováno během senescence listů *Arabidopsis* (Jensen *et al.*, 2010; Breeze *et al.*, 2011; Kou *et al.*, 2012). V odpovědi na biotický a abiotický stres se uplatňují také WRKY transkripční faktory, zapojené i při vývoji a klíčení semen. Mezi WRKY transkripční faktory spojené se senescencí se řadí např. WRKY53, WRKY54 nebo WRKY70 (Woo *et al.*, 2013).

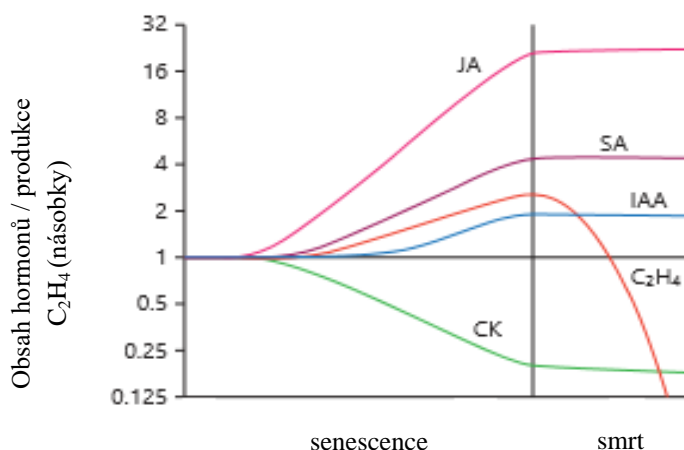
2.2 Rostlinné hormony

Všechny hlavní třídy fytohormonů ovlivňují senescenci, ať už pozitivním - urychlují senescenci, nebo negativním způsobem - oddalují senescenci (Obr. 1) (Gan a Amasino, 1997; Khan *et al.*, 2014).



Obr. 1 Vliv fytohormonů auxinů (AUX), cytokininů (CK), kyseliny abscisové (ABA), kyseliny giberelové (GA), etylenu (ET) a kyseliny jasmonové (JA) na jednotlivá vývojová stádia rostlin. Převzato z Curaba *et al.*(2014) a upraveno.

Za hormony, které senescenci oddalují, jsou považovány auxiny, cytokininy, kyselina giberelová a kyselina salicylová. Naopak mezi fytohormony podporující senescenci patří kyselina abscisová, kyselina jasmonová a etylen (Smart, 1994; Gan a Amasino, 1996). Vliv cytokininů a etylenu na senescenci bude podrobněji popsán v kapitole 2.5.



Obr. 2 Změny v produkci etylenu (C_2H_4) a obsahu kyseliny jasmonové (JA), kyseliny salicylové (SA), cytokininů (CK) a kyseliny indolactové (IAA) během senescence u *Arabidopsis* (*A. thaliana* L.). Převzato z Khan *et al.* (2014) a upraveno.

Mezi biologicky aktivní auxiny patří kyselina indolactová (IAA) a kyselina indolmásečná. Tyto auxiny jsou syntetizovány z tryptofanu a vyskytují se převážně ve vázaných formách (Kelley *et al.*, 2012). Měření obsahu auxinů v senescenčních listech ukázalo, že i když obsah vázané IAA klesal, obsah volné a bioaktivní IAA se dvojnásobně zvýšil (Obr. 2). Bylo zjištěno, že IAA je zapojena také do procesu oddálení senescence v oddělených listech *Arabidopsis* (Noh a Amasino, 1999; Cohen *et al.*, 2003).

Kyselina salicylová (SA) je fenolická sloučenina, která hraje roli např. při vyvolání obranné reakce proti biotrofním patogenům. V průběhu senescence její obsah v rostlinách vzrůstá až na čtyřnásobek původního obsahu (Obr. 2). Narušení biosyntézy SA způsobilo u rostlin hypersenzitivitu vůči patogenům společně se snížením exprese některých SAG a oddálením senescence (Morris *et al.*, 2000).

Pozitivní vliv kyseliny jasmonové (JA) na senescenci studovali např. Ueda a Kato (1980) a později jej potvrdili také Reinbothe *et al.* (2009). Z pelyňku (*Artemisia absinthium* L.) byla izolována sloučenina, která byla identifikována jako metyljasmonát (MeJA), což je volatilní ester JA. Aplikací MeJA na oves (*Avena sativa* L.) byl urychlen rozklad chlorofylu. Dalšími experimenty na různých rostlinných druzích, např. s oddělenými listy ječmene, byl potvrzen vliv JA na urychlení změn, kterým rostlina podléhá při senescenci, a to zejména na rychlost rozkladu chlorofylu (Reinbothe *et al.*, 2009). Exogenní aplikace JA na rostliny *Arabidopsis* podporuje listovou senescenci včetně poklesu fotochemické účinnosti fotosystému II, exprese některých SAG a také genů biosyntézy JA (He *et al.*, 2002).

Abscisová kyselina (ABA) je klíčovým hormonem v reakcích rostlinných organismů na abiotické stresy. Kromě toho také zpomaluje růst rostlin a připravuje rostlinu na období vegetačního klidu. Bylo dokázáno, že ABA moduluje také průběh senescence, kdy postřikem listů roztokem kyseliny abscisové došlo k urychlení stárnutí u rýže (*Oryza sativa* L.) a kukuřice (He a Jin, 1999), projevující se zejména snížením obsahu chlorofylu a některých proteinů (Ray *et al.*, 1983). Bylo také zjištěno, že se endogenní obsah ABA v senescentních listech zvyšuje a exogenně aplikovaná ABA indukuje expresi několika SAG (Weaver *et al.*, 1998). Přesný mechanismus účinku ABA na stárnutí listů nebyl zatím zcela objasněn.

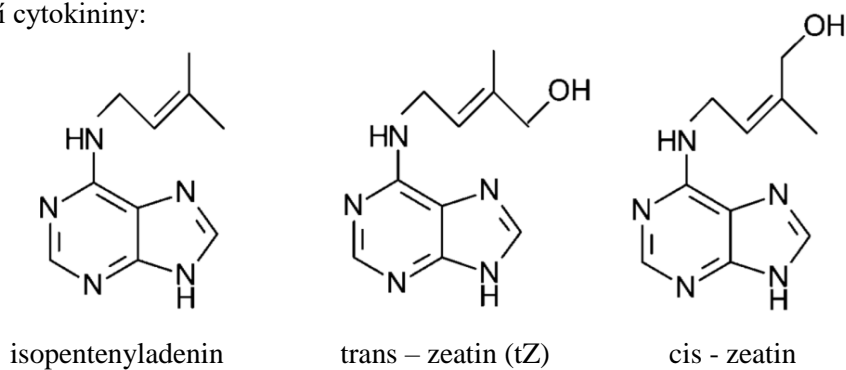
2.3 Cytokininy

Název cytokininů (CK) byl odvozen od jejich schopnosti podporovat cytokinezi. Ačkoli se jedná o poměrně dobře prostudovanou třídu fytohormonů, molekulární mechanismy biosyntézy CK a jejich působení v jednotlivých vývojových stádiích rostlin nejsou zatím zcela objasněny. Prvním identifikovaným CK byl kinetin (KIN), objevený v autoklávovaném sledím spermatu (Miller *et al.*, 1955), prvním objeveným rostlinným CK byl poté trans-zeatin (tZ) a to v nezralém endospermu kukuřice (Letham a Miller, 1965).

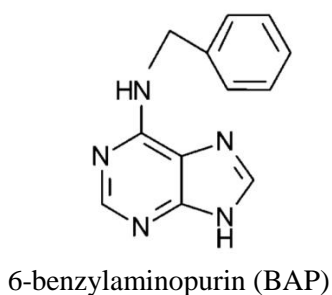
2.3.1 Rozdělení a struktura cytokininů

Cytokininy lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to na přirozeně se vyskytující a syntetické (Obr. 3). Přirozeně se vyskytující CK jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem na atomu dusíku (N^6), který má isoprenoidní či aromatický charakter. Mezi přírodní CK s isoprenoidním postranním řetězcem patří např. isopentenyladenin, zeatin a dihydrozeatin. Isopentenyladenin a zeatin jsou dva fytohormony ze třídy CK, které se ve vyšších rostlinách vyskytují v největší míře (Lim *et al.*, 2007). Zástupci CK s aromatickým řetězcem jsou např. kinetin a 6-benzylaminopurin (BAP), jakož i jeho hydroxylované formy - topoliny. Syntetické CK jsou odvozené od fenylničoviny a zahrnují sloučeniny jako je např. difenylničovina (DPU), thidiazuron (TDZ) nebo N-(2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenylničovina (CPPU) (Mok a Mok, 2001).

Isoprenoidní cytokininy:



Aromatické cytokininy:



Obr. 3 Chemická struktura vybraných isoprenoidních a aromatických cytokininů. Převzato z Mok *et al.*, (2005) a upraveno.

2.3.2 Vliv cytokininů na senescenci

Cytokininy hrají důležitou a nezastupitelnou roli v mnoha vývojových procesech, např. při klíčení, ve vývoji orgánů, formování stonkového meristému a zejména pak při senescenci listů (Mok a Mok, 2001). Obsah CK v rostlinách se v jednotlivých stádiích vývoje mění, přičemž v průběhu senescence dochází k jeho snížení. Rozhodujícím faktorem působení CK v rostlinách je jejich dostupnost, optimální koncentrace a správné místo pro interakci se specifickým rostlinným receptorem (Frébort *et al.*, 2011). CK jsou známy pro svou antisenescenční aktivitu, kdy lze zvýšením endogenního obsahu, ale také exogenní aplikací CK u řady jednoděložných i dvouděložných rostlinných druhů senescenci oddálit (Hwang *et al.*, 2012). Zvýšení endogenního obsahu CK v rostlině zahrnuje transformaci dané rostliny a to nejčastěji prostřednictvím gramnegativní půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nesoucího gen kódující isopentenyltransferasu (IPT), což je enzym katalyzující první krok syntézy CK (Smart *et al.*, 1991; Gan a Amasino, 1995). Listová senescence byla tímto způsobem úspěšně oddálena u transgenních rostlin několika významných kulturních

plodin jako je rýže, bavlna nebo kasava, které exprimovaly vnesený gen IPT pod promotorem SAG12, genu zapojeném do procesu senescence (Lin *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Při obou způsobech zvýšení obsahu CK, tedy exogenně i endogenně, dochází ke zpomalení senescenčních změn, např. rozkladu chlorofylu (Holub *et al.*, 1998) a karotenoidů (Chernyad'ev a Monakhova, 2003) nebo degradaci proteinů fotosyntetického aparátu (Badenoch-Jones *et al.*, 1996; He a Jin, 1999). Bylo prokázáno, že CK ovlivňují biosyntézu chlorofylu (Zubo *et al.*, 2008) a zpomalují pokles obsahu chlorofylů (Kao, 1980; Jordi *et al.*, 2000), ačkoli zatím není znám přesný molekulární mechanismus, kterým jsou CK do tohoto procesu zapojeny. Cytokininy rovněž zvyšují účinnost fotosyntézy (Yaronskaya *et al.*, 2006) a zpomalují nárůst lipidové peroxidace, ke kterému v průběhu senescence dochází. Mechanismus působení CK na zpomalení lipidové peroxidace pravděpodobně spočívá ve zvýšení aktivity enzymů antioxidantního systému (např. Çağ *et al.*, 2003; Dertinger *et al.*, 2003). K oddálení senescence u oddělených listů prostřednictvím exogenní aplikace CK však nedochází vždy, velký vliv v těchto experimentech mají také vnější faktory (Noodén a Leopold, 1978). Jedním z nich je intenzita PAR aplikovaná na použitý rostlinný materiál, jelikož při vysoké intenzitě může dojít k rychlejší degradaci chlorofylů, zatímco např. uložení rostlinného materiálu po ošetření CK do tmy může tyto změny zpomalit (Genkov *et al.*, 1997; Rulcová a Pospíšilová, 2001; Vlčková *et al.*, 2006). Příkladem je ošetření listových disků 5ti týdenních *wild type* (*wt*) a mutantních, etylen rezistentních (*er*), rostlin *Arabidopsis* cytokininem BAP, kdy došlo ke zpomalení senescence pouze v případě, že byly listové disky *wt* rostlin po ošetření uloženy ve tmě. V tomto případě však došlo také k mírnému zvýšení produkce etylenu (Zacarias *et al.*, 1990; Chory *et al.*, 1994). Ošetření disků mutantních *er* rostlin roztokem BAP neovlivnilo výrazně obsah chlorofylů, ačkoli došlo k poklesu produkce etylenu. U oddělených listových disků, které byly po ošetření BAP uchovávány při světle, došlo k výraznému urychlení degradace chlorofylu a to u disků obou testovaných rostlin (*wt* i *er*) (Zacarias *et al.*, 1990). Cytokininy také nahrazují světlo při indukci několika aspektů de-etiolace. Ve tmě může CK indukovat expresi některých genů jako je *cab*, *chs* nebo *rbcS*, které jsou normálně indukovány světlem (Chory *et al.*, 1991). Při oddálení senescence prostřednictvím CK je zásadní také použitá koncentrace daného roztoku CK, jelikož vysoká koncentrace způsobuje naopak urychlení stárnutí.

2.3.3 Vliv cytokininových derivátů na senescenci

Antisenescenčnímu účinku nově připravených CK derivátů se věnovala a stále věnuje řada autorů (např. Holub *et al.*, 1998; Doležal *et al.*, 2007; Mik *et al.*, 2011).

Doležal *et al.* (2007) studovali cytokininové působení více než čtyřiceti aromatických derivátů odvozených od BAP v nejčastěji používaných cytokininových biotestech (kalusovém, amarantovém a senescenčním). Jednalo se o řadu benzyladenosinů, které byly substituovány např. jedním či více atomy halogenů (fluor, chlor, brom), a to v různých pozicích (*ortho*-, *meta*-, *para*-), ale také různé hydroxy- a methoxyderiváty. Biologická aktivita těchto derivátů byla porovnávána s BAP. Z použitých biotestů bylo nejvýraznějších výsledků dosaženo v senescenčním testu, který je založen na schopnosti CK zpomalit pokles obsahu chlorofylu během indukované senescence u oddělených listů pšenice. Prostřednictvím těchto experimentů bylo zjištěno, že některé z testovaných derivátů vykazují až o 220 % vyšší účinnost oproti BAP. Mezi tyto nejaktivnější nově připravené sloučeniny patřily zejména deriváty nesoucí v postranním řetězci atom fluoru. Zároveň bylo zjištěno, že cytokininová aktivita téměř 50 % nově připravených sloučenin je v porovnání s BAP vyšší. Ačkoli bylo u některých připravených derivátů dosaženo významných výsledků, žádný z nich nedokázal zcela aktivovat cytokininové receptory CRE1/AHK4 a AHK3. Toto zjištění podpořilo předchozí hypotézu autorů, podle které v rostlinách může existovat odlišný mechanismus pro vnímání aromatických a ostatních cytokininů. Míra účinku derivátů na oddálení senescence výrazně závisí na postranním řetězci daného CK derivátu a také pozici postranního řetězce na benzenovém kruhu. Jako deriváty s nejvyšší aktivitou byly vyhodnoceny halogenderiváty nesoucí atom fluoru, případně atom fluoru a chloru současně, výrazně aktivní byly také monomethoxyderiváty. V těchto experimentech bylo potvrzeno, že deriváty nesoucí hydroxylovou skupinu v pozici *meta*- vykazují vyšší účinnost než ty, které nesou hydroxy- skupinu v poloze *para*-. Aktivita několika nově připravených derivátů, které byly substituovány v poloze *para*-, byla nižší, než aktivita BAP (Doležal *et al.*, 2007). Ke snížení aktivity daného derivátu může docházet také v poloze *ortho*- (Kamínek *et al.*, 1987; Holub *et al.*, 1998).

Kromě chemické struktury CK derivátů závisí jejich antisenescenční účinek také na metodice, která je v senescenčním testu použita. Holub *et al.* (1998) třemi různými způsoby exogenně aplikovali různé koncentrace (10^{-8} - 10^{-4} mol.l⁻¹) roztoků BAP, *trans*-zeatinu (*tZ*), *meta*-topolinu (*mT*) a *ortho*-topolinu (*oT*) na oddělené listové segmenty pšenice. Listové segmenty byly buď testovanou látkou postříkány, nebo umístěny

do roztoku CK celým povrchem či řezem. Po ošetření danými roztoky a inkubaci (při teplotě 25 °C po dobu 4 dní) byly listové segmenty hodnoceny kromě senescenčního testu také na základě biotestu amarantového i kalusového. Téměř ve všech použitých biotestech byl BAP efektivnější než *tZ*, kromě senescenčního testu, při kterém byly segmenty umístěny do CK roztoků řezem. V tomto testu byla antisenescenční aktivita BAP naopak nižší než *mT* a *tZ*, nejméně účinný byl *oT* (Holub *et al.*, 1998).

Mik *et al.* (2011) připravili celkem osm N⁹-substituovaných derivátů KIN, které následně charakterizovali různými fyzikálně-chemickými metodami včetně Cl⁺ hmotnostní spektrometrie a ¹H NMR spektroskopie a také je podrobili senescenčnímu testu. Senescenční test byl proveden za světelných podmínek i za tmy. Ve tmě nejúčinněji oddalovaly senescenci nově připravené deriváty, které nesly krátký halogenalkylový řetězec (chlorethyl, bromethyl). Pouze 6-furfurylamino-9-(2-chlorethyl)purin vykazoval v tomto testu vyšší aktivitu než KIN (o více než 20 %). Schopnost halogenalkylových derivátů CK oddálit pokles obsahu chlorofylu byla vysoce závislá na délce alkylového řetězce a na atomu halogenu, např. aktivita derivátu s navázaným chlorbutylovým řetězcem byla nižší než u chlorethylového analogu, zatímco derivát nesoucí v substituci brombutylový řetězec úplně ztratil antisenescenční účinek KIN (Mik *et al.*, 2011).

Deriváty CK mohou kromě antisenescenčních účinků vykazovat i další vlastnosti, díky kterým by v budoucnosti mohly najít využití např. v medicíně. Příkladem může být testování cytotoxicity nově připravených benzyladenosinů odvozených od BAP, které bylo provedeno Doležalem *et al.* (2007). Ačkoli byly některé sloučeniny téměř inaktivní, u jiných byla zaznamenána relativně vysoká cytotoxicita vůči buněčným liniím odvozeným od T-lymfoblastické leukémie (CEM), promyelocytické leukémie (HL-60), lidskému malignímu melanomu (G-361), lidské chronické myeloidní leukémii (K-562), karcinomu prsu (MCF7), lidskému osteogennímu sarkomu (HOS) a myšímú melanomu (B16). Nejvyšší cytotoxicita vůči leukemickým buněčným liniím a MCF7 liniím byla vždy spojena s hydroxylací dané sloučeniny v poloze *ortho*-, vysokou aktivitu také vykazovaly deriváty nesoucí na benzylaminopurinu atom fluoru. Fluoroderiváty byly jako jediné toxické vůči normálním myším fibroblastům (NIH3T3). Nebyla pozorována aktivita žádné testované sloučeniny vůči HOS buněčným liniím (Doležal *et al.*, 2007).

Cytokininy i jejich syntetické deriváty mohou být díky svým vlastnostem využity také v zemědělství. Byla již provedena řada experimentů, při kterých byly CK jako BAP, KIN nebo TDZ exogenně aplikovány např. na rostliny rajčete, špenátu, bavlníku, jabloně, hrušně, luštěnin či obilnin jako je pšenice a oves, za účelem zlepšení některých vlastností, např. zvýšení výnosu, urychlení doby kvetení, oddálení senescence nebo zvýšení hmotnosti plodů (Langer *et al.*, 1973; Elfving *et al.*, 1993; Malik *et al.*, 2002; Duranni *et al.*, 2010; Haroun *et al.*, 2011). Koprna *et al.* (2016) provedli testování účinku aromatického derivátu 2-chloro-6-(3-methoxybenzyl)aminopurinu (2-Cl-3-MeOBAP), odvozeného od BAP, na rostliny ječmene jarního a pšenice zimní. Tento derivát byl vybrán zejména díky své vysoké aktivitě v běžných CK testech. Prostřednictvím polních experimentů, které probíhaly v letech 2012-2014, bylo zjištěno, že exogenní aplikace 2-Cl-3-MeOBAP na rostliny může vést ke zvýšení biologického výnosu např. prostřednictvím zvýšení počtu odnoží a redukcí neproduktivních odnoží. Pozitivní vliv derivátů CK na rostliny však závisí na mnoha faktorech. Mezi nejdůležitější z nich patří výběr derivátu a metodika jeho aplikace, výběr rostliny, růstové podmínky a také stádium vývoje, při kterém je derivát na rostlinu aplikován (Koprna *et al.*, 2016).

2.4 Etylen

Etylen je nejjednodušší rostlinný hormon a jako jediný se v přirozených podmínkách vyskytuje v plynném skupenství. Navzdory své strukturní jednoduchosti se podílí na regulaci široké škály vývojových procesů, mezi které patří klíčení semen, prodlužování buněk, vývoj kořenových vlásků, kvetení a zrání plodů (Abeles *et al.*, 1992; Johnson a Ecker, 1998). Biosyntéza etylenu je indukována v senescenčních listech a v dozrávajícím ovoci (Jing *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007). Obsah etylenu během senescence vzrůstá v mnoha rostlinných druzích, včetně *Arabidopsis* (např. Lim *et al.*, 2007).

Etylen je zapojen do regulace senescence rostlin tak, že moduluje její průběh. Při exogenní aplikaci etylenu na rostliny dochází k poklesu obsahu chlorofylu a k indukci exprese SAG (Jing *et al.*, 2002). Etylen ovlivňuje také stovky dalších genů, a to na úrovni transkripce. Senescence je etylenem podporována až po dosažení určitého stáří listů, přičemž s rostoucím stářím listu se účinek etylenu zvyšuje. Čím starší listy jsou, tím větší je působení etylenu na SAG (Grbic *et al.*, 1995; Jing *et al.*, 2005). Účinek etylenu na urychlení změn spojených se senescencí však klesá při dlouhodobém

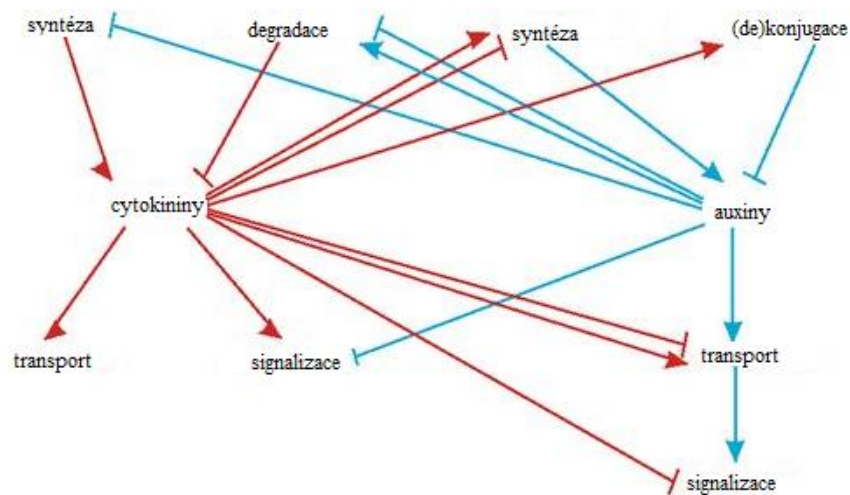
vystavení rostlin zvýšené koncentraci etylenu. Po určitém čase je vliv etylenu na probíhající senescenci téměř zanedbatelný (Kieber *et al.*, 1993).

V experimentech s mutantními rostlinami *Arabidopsis*, které byly necitlivé k etylenu – *etr1* (*ethylene-resistant*) a *ein2* (*ethylene-insensitive*) – vykazovaly listy těchto mutantních rostlin významně oddálenou senescenci. Tímto způsobem byl objeven význam etylenové signalizační dráhy jakožto pozitivního regulátoru při stárnutí listů. Naopak transgenní rostliny *Arabidopsis* a rajčat, které konstantně nadprodukovaly etylen, nevykazovaly rychlejší nástup senescence. Tímto bylo potvrzeno, že etylen senescenci přímo nespouští, ale začíná působit až po jejím nástupu (Lim *et al.*, 2007).

Účinek etylenu na oddělené listy *Arabidopsis* během indukované senescence studovali např. také Chao *et al.* (1997). Oddělené listy *wild type* (*wt*) a mutantních *etr1-3*, *etr2-1* a *ein3-1* rostlin byly po dobu tří dnů inkubovány ve tmě za přítomnosti vzduchu nebo etylenu. Porovnáním obsahu chlorofylů v listech inkubovaných v přítomnosti etylenu a vzduchu bylo zjištěno, že etylen urychluje pokles obsahu chlorofylů u *wt* listů. Listy mutantních rostlin *etr1-3* a *etr2-1* byly k etylenu méně citlivé, proto u nich došlo k menšímu poklesu obsahu chlorofylů (Chao *et al.*, 1997).

2.5 Působení cytokininů a etylenu na senescenci

Rostlinné hormony spolu navzájem interagují např. prostřednictvím ovlivňování biosyntetické dráhy jiných fytohormonů. Nejdéle známá a nejvíce studovaná je interakce cytokininů a auxinů (Obr. 4). Řada autorů se také věnovala studiu interakcí cytokininů s dalšími třídami fytohormonů (např. Wright, 1980; Cary *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1998). Existuje řada studií, které potvrzují částečnou modulaci biosyntézy etylenu některými cytokininy, např. BAP (např. Kao a Yang, 1983; Yang a Hoffman, 1987; Mattoo a Suttle, 1991; Abeles *et al.*, 1992). Přesný vztah mezi dráhou biosyntézy etylenu a cytokininů nebyl zatím zcela objasněn.



Obr. 4 Interakce cytokininů a auxinů. Převzato z El-Showk *et al.*, (2013) a upraveno.

Roli etylenu při senescenci oddělených listů rýže (*Oryza sativa* L. cv. 'Taichung' Native 1) a změny v jeho produkci studovali např. Kao a Yang (1983). Na oddělené třetí listy osmidenních rostlin aplikovali BAP a poté hodnotili změny, ke kterým docházelo v důsledku indukované senescence a také vliv aplikovaného cytokininu na její oddálení. Kromě rychlosti degradace chlorofylu a změn v produkci etylenu se věnovali také vlivu světla na oddálení senescence. Senescence v oddělených listech uchovaných na světle byla efektivněji oddálena a došlo také k částečné inhibici produkce etylenu. Degradace chlorofylu za těchto podmínek byla tedy pomalejší než ve tmě, kdy docházelo k výrazně vyšší produkci etylenu. Aplikace BAP na oddělené listy vedla k vyšší produkci etylenu jak na světle, tak ve tmě, degradace pigmentů však byla pomalejší. Autoři vysvětlují efekt působení BAP hypotézou, že BAP sice zvyšuje produkci etylenu, ale zároveň dochází ke snížení citlivosti listů k produkovanému etylenu (Kao a Yang, 1983).

Woeste *et al.* (1999) testovali, jaký vliv na produkci etylenu bude mít ošetření etiolovaných semenáčků *Arabidopsis* (*A. thaliana* L. ekotyp Wassilewskija) CK (KIN nebo BAP) nebo auxinem (2,4-D). V obou případech, tedy při ošetření semenáčků CK či 2,4-D, došlo ke zvýšení produkce etylenu. Pokud byl semenáček ošetřen CK i auxinem zároveň, výsledný účinek hormonů byl synergický. Množství etylenu, které bylo vyprodukováno po aplikaci obou sloučenin současně, dosahovalo vyšší hodnoty, než byl součet jednotlivých účinků aplikovaných fytohormonů (Woeste *et al.*, 1999).

Z výše uvedených informací vyplývá, že CK hrají důležitou roli v nejrůznějších rostlinných procesech, od klíčení až po senescenci. V průběhu senescence CK zpomalují změny s ní spojené, jako je snižování obsahu pigmentů či pokles fotosyntetické aktivity. Působení CK je do velké míry ovlivňováno vnitřními i vnějšími faktory. Velmi důležitá je např. koncentrace a chemická struktura použitého CK. Některé CK mohou ovlivňovat i produkci etylenu, který naopak senescenci po jejím nástupu podporuje a to při zachování jejich vlivu na oddálení senescence. Testování antisenescenčního účinku nově připravených derivátů CK probíhá nejčastěji prostřednictvím tzv. senescenčního testu, kdy je daná látka aplikována na oddělené listy pšenice a průběh senescence je hodnocen na základě obsahu chlorofylů. Z tohoto důvodu byly oddělené segmenty listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) použity i v této práci. Z výsledků předběžných experimentů vyplývalo, že CK deriváty nově připravené na oddělení Chemické biologie a genetiky Centra Regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum působí odlišně v jednoděložných a dvouděložných rostlinách (ústní sdělení, Mgr. Zuzana Kučerová). Z tohoto důvodu byly k testování účinku látek použity také oddělené listy rostliny *Arabidopsis* (*A. thaliana* L. ekotyp Columbia). V této práci byl sledován vliv nově připravených derivátů odvozených od BAP s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA na obsah chlorofylu $a+b$ a karotenoidů, fotosyntetický aparát (parametr chlorofylové fluorescence F_v/F_m) a na produkci etylenu během indukované senescence.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Rostlinný materiál

V experimentech byly použity dva druhy rostlin. Jednalo se o pšenici jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) a *Arabidopsis* (*A. thaliana* L. ekotyp Columbia 0).

Semena pšenice byla vyseta do perlitu, zalita 1 l Hoaglandova roztoku (složení dle Tab. 1) a umístěna do fytokomory s definovanými podmínkami (25°C, světelný režim 16 h PAR o intenzitě 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ / 8 h tma). Primární listy sedmidenních rostlin byly vybrány na základě jejich obsahu chlorofylu, změřeného pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonsko). Selektovány byly listy, jejichž relativní obsah chlorofylu se nelišil o více než 5 %. Následně byly z vybraných listů odděleny segmenty o délce 4 cm od špičky listu.

Semena *Arabidopsis* byla stratifikována v destilované vodě při 4°C po dobu 3 dnů, poté vyseta do půdního substrátu typu Potgrond H (Klasmann-Deilmann, Německo) a následně pěstována ve fytotronu (PSI, Drásov, ČR) za definovaných podmínek (světelný režim 8 h PAR o intenzitě 110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplota 22°C / 16 h tma a teplota 20°C). Z šestitýdenních rostlin byly odděleny páté a šesté, vizuálně podobné listy.

Segmenty listů pšenice byly řezem, oddělené listy *Arabidopsis* řápkem, ponořeny do 200 μl roztoku cytokininu nebo cytokininových derivátů v mikrozkuvkách o objemu 0,25 ml. Použit byl 6-benzylaminopurin (BAP) a jeho deriváty s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci $10^{-5}\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěné v 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO). Deriváty cytokininů byly připraveny na oddělení Chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a laskavě poskytnuty Mgr. Karlem Doležalem, Dr., DSc. Jako kontrola bylo použito 200 μl 0,1% DMSO v destilované vodě. Pro každý roztok bylo použito 5 až 6 listů. Mikrozkuvky obsahující segmenty listů pšenice nebo oddělené listy *Arabidopsis* v roztocích BAP, cytokininových derivátů a DMSO byly vloženy do skleněných vialek o objemu 8 ml a uzavřeny víčky se septy. Takto připravené vzorky byly zabaleny do černé folie a uchovávány při teplotě 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) po dobu 6 dní po oddělení (dpo) listů v případě pšenice a 6, 4 nebo 5 dní v případě *Arabidopsis*. Kontrolní listy byly bezprostředně po oddělení adaptovány na tmu po dobu 30 min. Poté byl měřen parametr F_v/F_m prostřednictvím přístroje FluorCam700MF (PSI, Drásov,

ČR). Po měření byly listy vyfoceny, obkresleny a následně uloženy do mikrozkušavek o objemu 2 ml, zmraženy tekutým dusíkem a uloženy do hlubokomrazicího boxu s teplotou -80°C.

Tab 1 Složení Hoaglandova roztoku

Makroprvky	Použité množství [mg.l⁻¹]
Ca(NO ₃) ₂	940
MgSO ₄ .7H ₂ O	520
KNO ₃	660
NH ₄ H ₂ PO ₄	120
Mikroprvky	
H ₃ BO ₃	2,80
MnSO ₄ .H ₂ O	3,40
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,10
Chelaton 3 (Na ₂ EDTA)	37
FeSO ₄ .7H ₂ O	27
	Použité množství [μl.l⁻¹]
H ₂ SO ₄ (koncentrovaná)	25

3.1.2 Použité metody

V rámci této práce bylo provedeno měření relativního obsahu chlorofylu přístrojem SPAD-502, měření chlorofylové fluorescence pomocí fluorescenčního zobrazovacího systému FluorCam 700MF, analytické stanovení pigmentů a stanovení produkce etylenu oddělenými listy pšenice a Arabidopsis prostřednictvím plynové chromatografie ve spolupráci s Ing. Jaromírem Mikulíkem, Ph.D.

3.1.2.1 Měření obsahu chlorofylu

Pro měření relativního obsahu chlorofylu byl použit přístroj SPAD-502, který provádí měření transmitance ve dvou vlnových délkách (650 nm a 940 nm). Stanovení relativního obsahu chlorofylu proběhlo u sedmidenních rostlin pšenice za účelem selekce listů tak, aby obsahovaly srovnatelné množství chlorofylu. Měření probíhalo vždy ve vzdálenosti 1 cm od špičky listu na jeho adaxiální straně.

3.1.2.2 Měření parametrů chlorofylové fluorescence

Měření kontrolních listů bylo provedeno bezprostředně po jejich oddělení a adaptaci na tmu (30 min). K měření byl použit fluorescenční zobrazovací systém FluorCam 700MF. Podmínky měření byly definovány použitým protokolem s následujícími hodnotami: senzitivita 40 %, irradiance 100 % (relativní intenzita aktinického PAR odpovídala ozáření 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ v místě vzorků) a superradiance 100 % (relativní intenzita saturačního pulzu odpovídala ozáření 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ v místě vzorků). Segmenty listů pšenice nebo oddělené listy Arabidopsis byly vyjmuty ze skleněných vialek a pomocí průhledné lepicí pásky připevněny k desce z černého papíru za účelem zamezení jejich pohybu při měření. Listy byly přilepeny tak, aby došlo k pouze minimálnímu překrytí jejich plochy. Takto zafixované vzorky pak byly použity k měření parametrů maximální (F_m) a minimální (F_0) fluorescence vzorku adaptovaného na tmu, ze kterých byl vypočten maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (F_v/F_m).

$$(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$$

3.1.2.3 Stanovení produkce etylenu

Vzorky vzduchu z vialek s uzavřenými listy a listovými segmenty byly odebrány injekční stříkačkou 6. dpo v případě pšenice a 6., 4., nebo 5. dpo u Arabidopsis. Z vialky bylo odebráno vždy 1,5 ml vzduchu. Stanovení produkce etylenu pomocí plynového chromatografu FinniganTrace GC Ultra (ThermoElectron, Waltham, USA) bylo provedeno Ing. Jaromírem Mikulíkem, Ph.D.

3.1.2.4 Extrakce a analytické stanovení pigmentů

Jednotlivé listy a listové segmenty byly homogenizovány společně s uhlíčanem hořečnatým ve 2 ml vychlazeného 80% acetonu a dále centrifugovány po dobu 10 min při 3600 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byl zaznamenán celkový objem jednotlivých vzorků a poté bylo provedeno spektrofotometrické (Unicam UV 500, Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie) stanovení absorbance chlorofylového extraktu při vlnových délkách: 470 nm; 646,8 nm; 663,2 nm a 750 nm. Obsah pigmentů byl vypočítán s použitím rovnice podle Lichtenthalera (1987):

- pro výpočet obsahu chlorofylů $a+b$

$$\text{CHF}(A + B) = 7,15 \times (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \times (A_{646,8} - A_{750})$$

- pro výpočet obsahu karotenoidů

$$\text{CAR} = 1000 \times (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \times (12,25 \times A_{663,2} - A_{750}) - 2,79 \\ \times (A_{646,8} - A_{750}) - 5,1 \times (A_{663,2} - A_{750}) / 198 \times (V/S)$$

kde A_{470} ; $A_{663,2}$; $A_{646,8}$; A_{750} jsou hodnoty absorbance pigmentového extraktu v příslušných vlnových délkách, V [ml] značí objem daného vzorku a S [cm²] vyjadřuje plochu listu.

3.1.2.5 Grafické a statistické zpracování dat

Ke grafickému zpracování naměřených dat byl použit program MS Excel. V případě vyhodnocování dat F_v/F_m byly použity mediány a chybové úsečky značící horní a dolní kvartil. Při vyhodnocování obsahu chlorofylů $a+b$, karotenoidů a produkce etylenu byly použity průměrné hodnoty a chybové úsečky značící směrodatnou odchylku. Pro výpočet plochy listů a listových segmentů byl použit program ImageJ (<https://imagej.net/Welcome>). Produkce etylenu [nl] oddělenými listy Arabidopsis nebo oddělenými segmenty pšenice i obsah chl $a+b$ a karotenoidů [μg] byly poté vyjádřeny ve vztahu k celkové ploše listu [cm²].

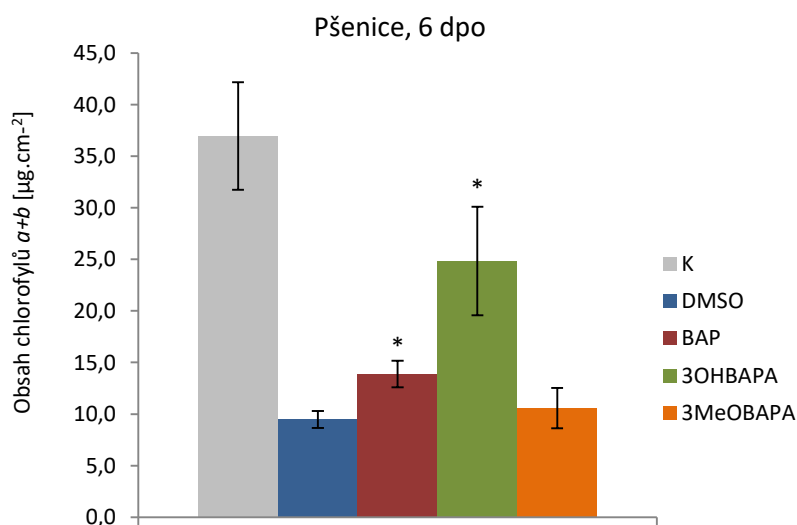
Statisticky významné rozdíly mezi působením jednotlivých roztoků (BAP, 3OHBAPA, 3MeOBAPA) a kontrolním roztokem (DMSO) byly vyhodnoceny prostřednictvím T-testu v programu MS Excel ($P < 0,05$). V grafickém zpracování jsou tyto statisticky významné rozdíly označeny hvězdičkou.

4 Výsledky

V rámci této bakalářské práce bylo provedeno analytické stanovení obsahu chlorofylů $a+b$ a karotenoidů, měření chlorofylové fluorescence (parametr F_v/F_m) a měření produkce etylenu u listových segmentů pšenice a oddělených listů *Arabidopsis* po ošetření cytokininem nebo nově připravenými cytokininovými deriváty. Hodnoty získané měřením byly vždy porovnávány s čerstvě oddělenými listy nebo s listy ošetřenými dimethylsulfoxidem (DMSO), který je běžně používán jako rozpouštědlo pro ředění roztoků cytokininů. Z tohoto důvodu byl 0,1% DMSO použit jako kontrolní roztok.

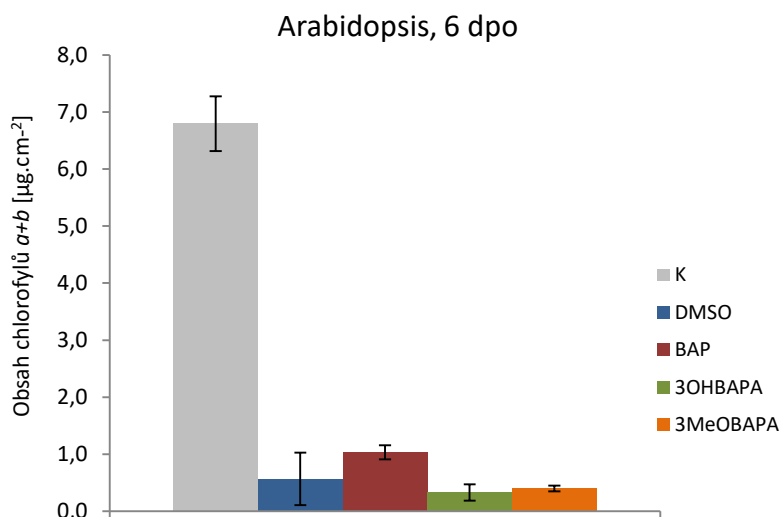
4.1 Obsah chlorofylů $a+b$

Vlivem indukované senescence došlo u listových segmentů pšenice k poklesu obsahu chl $a+b$, a to u všech použitých roztoků. Zejména listové segmenty ošetřené DMSO vykazovaly ve velké míře znaky pokročilé senescence, jako např. výrazné žloutnutí vlivem degradace chl $a+b$ (Obr. 11). U těchto neošetřených listových segmentů byl pozorován velmi výrazný pokles obsahu chl $a+b$, a to na 25 % hodnoty čerstvě oddělených listových segmentů (Obr. 5). Listové segmenty ošetřené BAP obsahovaly větší množství chl $a+b$ než neošetřené listové segmenty (40 % hodnoty čerstvě oddělených listů). Ošetření derivátem 3OHBAPA způsobilo udržení nejvyššího množství chl $a+b$ ze všech použitých sloučenin (65 % hodnoty čerstvě oddělených listových segmentů). Množství chl $a+b$ bylo v těchto segmentech v porovnání s listovými segmenty ošetřeny DMSO více než dvojnásobné. Naopak obsah chl $a+b$ v oddělených listových segmentech ošetřených derivátem 3MeOBAPA byl srovnatelný s DMSO.



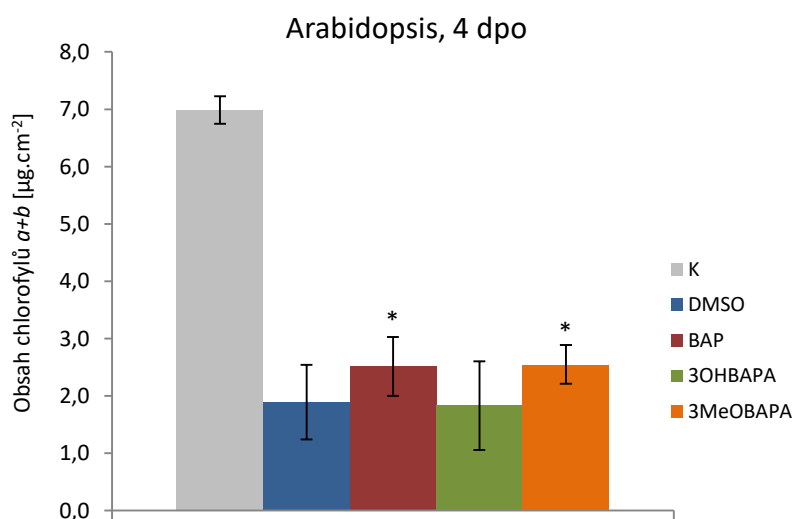
Obr. 5 Analyticky stanovený obsah chlorofylů $a+b$ v oddělených listových segmentech pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) bezprostředně (K) a 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátech s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

U všech oddělených listů *Arabidopsis*, které byly po ošetření příslušnými roztoky inkubovány ve tmě, byl 6. dpo zaznamenán velmi výrazný pokles obsahu chl $a+b$. V listech ošetřených DMSO došlo k poklesu obsahu chl $a+b$ na 10 % hodnoty čerstvě oddělených listů (Obr. 6). Ošetření listů žádnou z použitých látek nezpůsobilo statisticky významné rozdíly v obsahu chl $a+b$ v porovnání s neošetřenými (DMSO) listy.



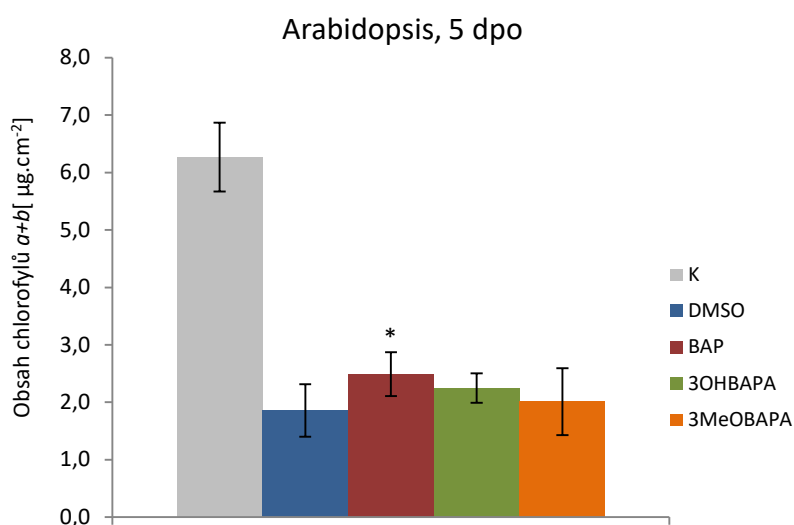
Obr. 6 Analyticky stanovený obsah chlorofylů $a+b$ v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, $n = 5$. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

Obsah chl $a+b$ v oddělených listech *Arabidopsis* ošetřených DMSO 4. dpo dosahoval 30 % hodnoty naměřené u čerstvě oddělených listů (Obr. 7). Při ošetření listů roztokem BAP byl obsah chl $a+b$ mírně vyšší než u neošetřených listů (DMSO; 35 % hodnoty čerstvě oddělených listů). Obsah chl $a+b$ v listech ošetřených 3OHBAPA byl srovnatelný s obsahem těchto pigmentů v neošetřených (DMSO) listech. Při inkubaci listů v derivátu 3MeOBAPA byl obsah chl $a+b$ mírně vyšší než u DMSO (35 % hodnoty čerstvě oddělených listů).



Obr. 7 Analyticky stanovený obsah chlorofylů $a+b$ v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 4. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátech s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, $n = 5$. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

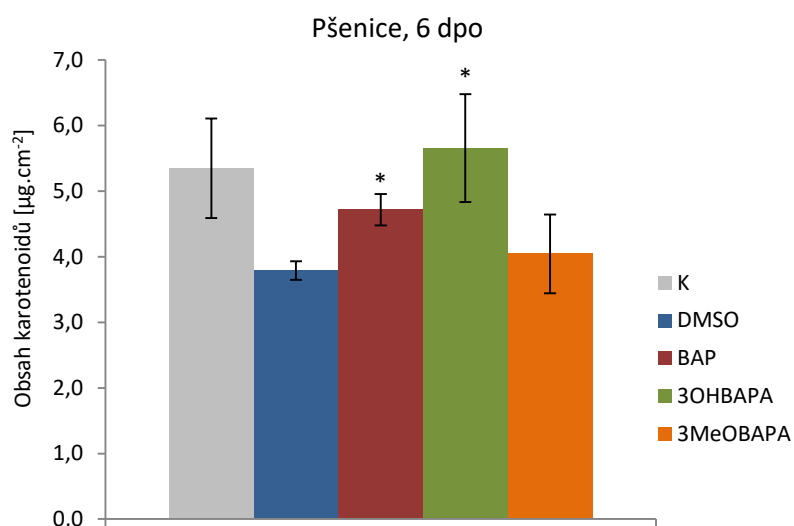
U oddělených listů *Arabidopsis* ošetřených DMSO byl 5. dpo zaznamenán pokles obsahu chl *a+b*, obsah těchto pigmentů v listech dosahoval 25 % hodnoty čerstvě oddělených listů (Obr. 8). Ošetření listů roztokem BAP způsobilo udržení vyššího obsahu chl *a+b* než u listů inkubovaných v DMSO (40 % hodnoty čerstvě oddělených listů). V listech, které byly ošetřeny 3OHBAPA a 3MeOBAPA byl obsah chl *a+b* statisticky srovnatelný s DMSO.



Obr. 8 Analyticky stanovený obsah chlorofylů *a+b* v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, n = 6.* značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

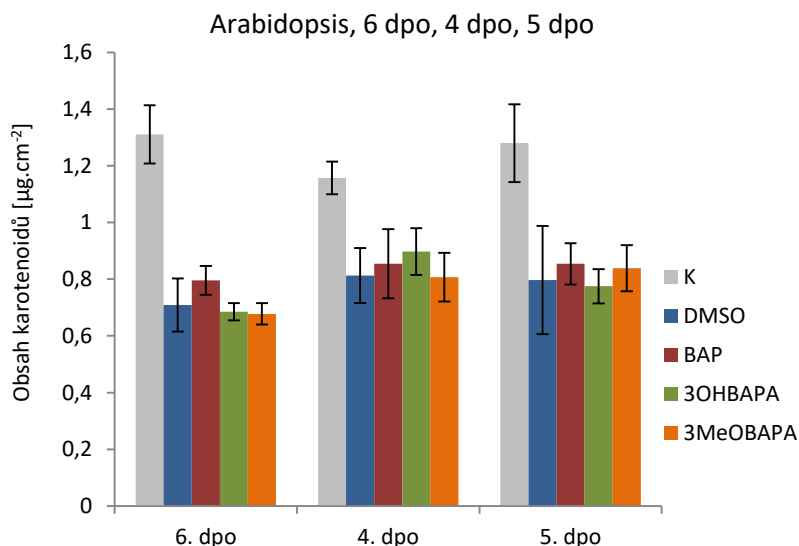
4.2 Obsah karotenoidů

Obsah karotenoidů v oddělených segmentech neošetřených (DMSO) listů pšenice dosahoval 70 % hodnoty čerstvě oddělených listů (Obr. 9). Při ošetření listových segmentů roztokem BAP byl obsah karotenoidů v porovnání s neošetřenými listy (DMSO) vyšší (přibližně 90 % čerstvě oddělených listů). Nejvyšší obsah karotenoidů byl zaznamenán v listových segmentech ošetřených derivátem 3OHBAPA, naměřené množství bylo 105% v porovnání s čerstvě oddělenými listovými segmenty. Použití derivátu 3MeOBAPA způsobilo udržení srovnatelného množství karotenoidů jako u DMSO (přibližně 75 % hodnoty čerstvě oddělených listů).

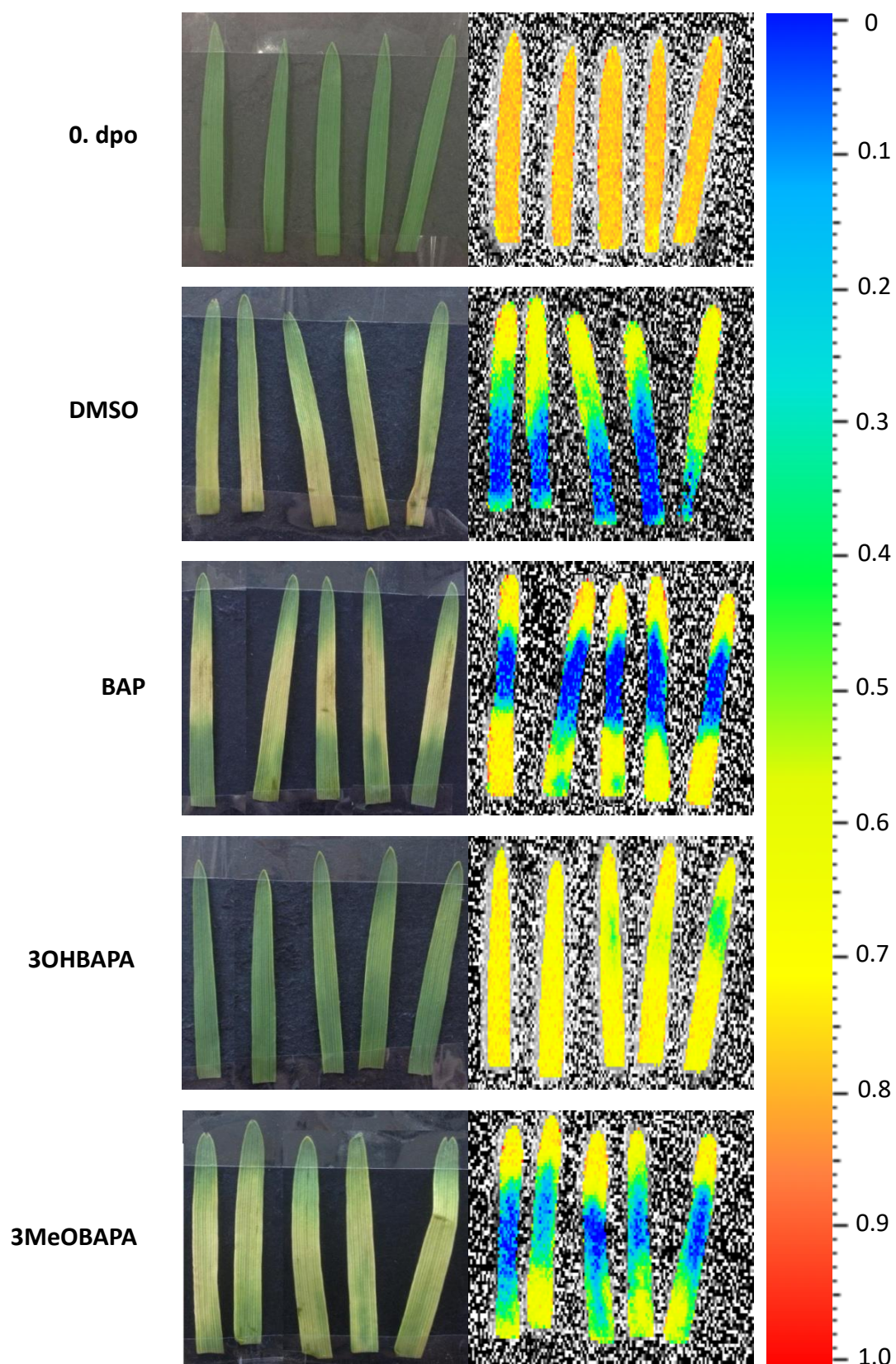


Obr. 9 Obsah karotenoidů v oddělených listových segmentech pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) bezprostředně (K) a 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

V případě oddělených listů *Arabidopsis* byl pokles obsahu karotenoidů zaznamenán u všech použitých variant (dnů po oddělení) (Obr. 10). Při exogenní aplikaci jednotlivých sloučenin na oddělené listy *Arabidopsis* nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl v obsahu karotenoidů mezi použitými látkami a DMSO.



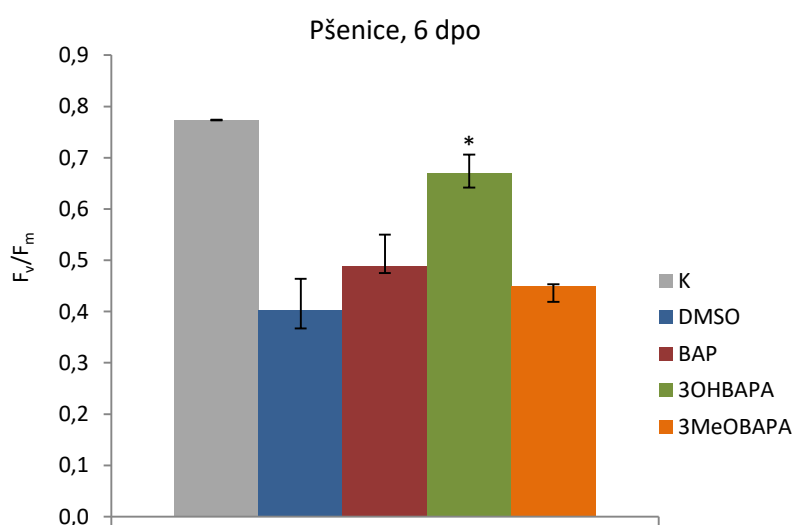
Obr. 10 Obsah karotenoidů v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 6., 4. a 5. den po oddělení (dpo) a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou průměrné hodnoty, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, n = 5-6.* značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO v rámci varianty (dne po oddělení), $P < 0,05$.



Obr. 11 Imaging parametru F_v/F_m v oddělených listových segmentech pšenice jarní (*Triticum aestivum* L., cv. Aranka) bezprostředně (0. dpo) a 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹.

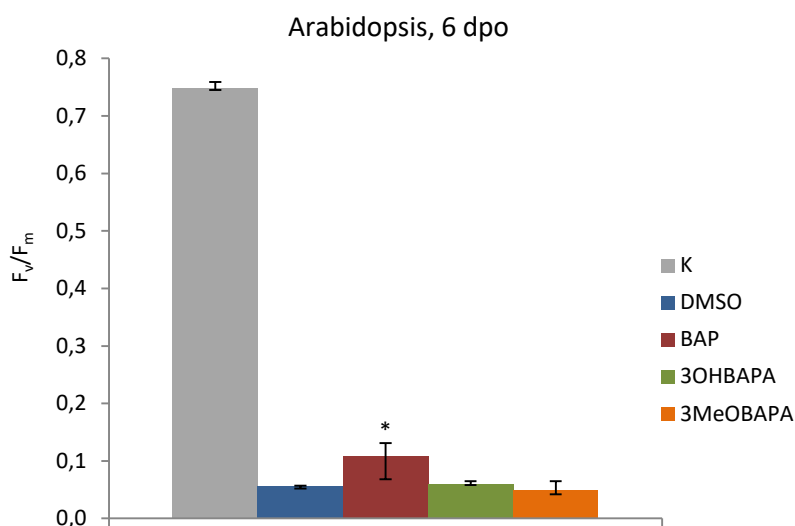
4.3 F_v/F_m

V listových segmentech pšenice, které byly ošetřeny DMSO, došlo vlivem indukované senescence k poklesu parametru F_v/F_m na přibližně 50 % hodnoty čerstvě oddělených listových segmentů (Obr. 12). V případě ošetření listových segmentů roztokem BAP byl F_v/F_m srovnatelný s DMSO. U listových segmentů, které byly ošetřeny derivátem 3OHBAPA, dosahoval F_v/F_m nejvyšší hodnoty v porovnání s ostatními látkami (85 % hodnoty čerstvě oddělených listových segmentů). V listových segmentech ošetřených derivátem 3MeOBAPA byl parametr F_v/F_m srovnatelný s DMSO.



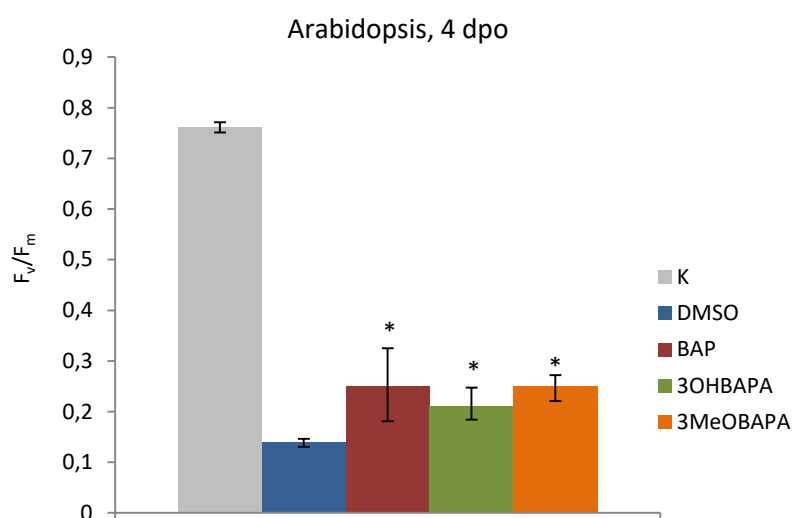
Obr. 12 Parametr F_v/F_m během indukované senescence v oddělených segmentech listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L., cv. Aranka) bezprostředně (K) a 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil, n=5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

V oddělených listech *Arabidopsis* byl 6. dpo parametr F_v/F_m v porovnání s kontrolními listy velmi výrazně nižší, a to u všech použitých látek (Obr. 13). V případě DMSO byl F_v/F_m přibližně 10% oproti čerstvě odděleným listům, u BAP pak 15%. Při použití derivátů 3OHBAPA a 3MeOBAPA nebyl zaznamenán žádný výrazný vliv na udržení F_v/F_m , naměřené hodnoty byly srovnatelné s DMSO.



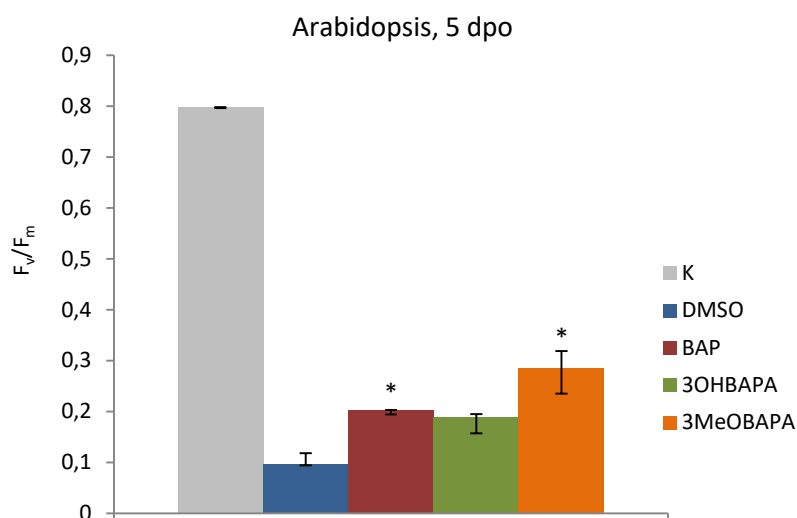
Obr. 13 Parametr F_v/F_m během indukované senescence v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10⁻⁵ mol.l⁻¹. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, P<0,05.

Parametr F_v/F_m v oddělených listech *Arabidopsis* dosahoval 4. dpo u neošetřených listů (DMSO) 20 % hodnoty naměřené u čerstvě oddělených listů (Obr. 14). BAP i oba deriváty byly v udržení F_v/F_m účinnější, při ošetření těmito roztoky se F_v/F_m u všech použitých látek pohyboval mezi 30 a 35 % hodnoty čerstvě oddělených listů.



Obr. 14 Parametr F_v/F_m během indukované senescence v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 4. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

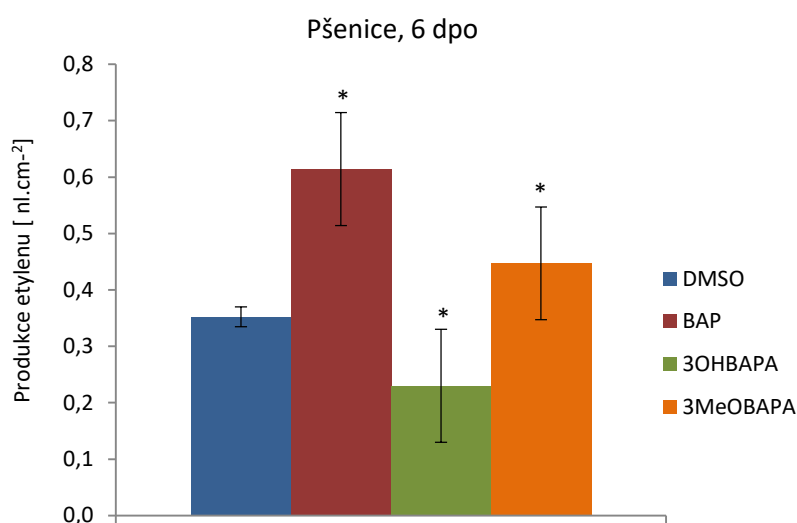
U oddělených listů *Arabidopsis* inkubovaných 5 dní po oddělení v DMSO došlo vlivem indukované senescence k poklesu parametru F_v/F_m na přibližně 15 % hodnoty čerstvě oddělených listů (Obr. 15). V listech ošetřených BAP byl naměřen výrazně vyšší F_v/F_m než u DMSO (25 % hodnoty čerstvě oddělených listů). Působení 3OHBAPA bylo srovnatelné s DMSO. F_v/F_m v listech ošetřených derivátem 3MeOBAPA byl nejvyšší ze všech použitých látek (dosahoval přibližně 35 % F_v/F_m čerstvě oddělených listů).



Obr. 15 Parametr F_v/F_m během indukované senescence v oddělených listech *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0) bezprostředně (K) a 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil, n=6. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

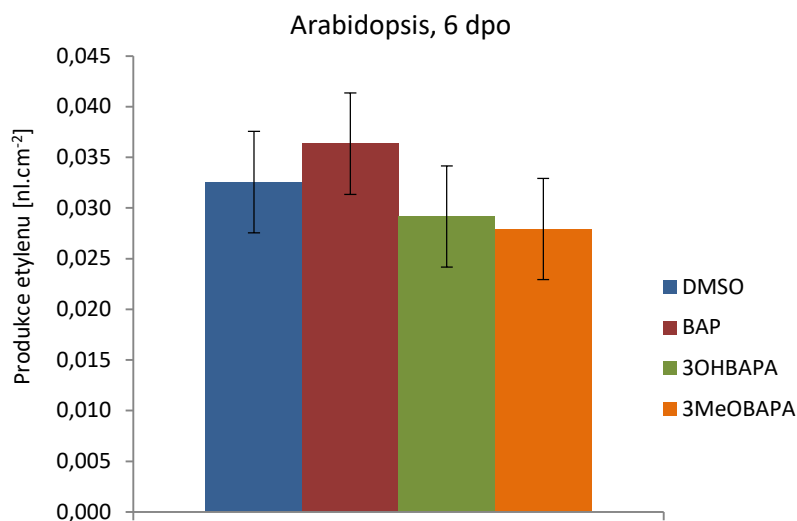
4.4 Obsah etylenu

Oddělené segmenty listů pšenice inkubované v BAP produkovaly o 75 % více etylenu než neošetřené (DMSO) listové segmenty (Obr. 16). Listové segmenty ošetřené derivátem 3OHBAPA produkovaly v porovnání se všemi použitými roztoky nejméně etylenu, přibližně o 35 % méně než neošetřené (DMSO) listové segmenty. Po inkubaci segmentů v derivátu 3MeOBAPA byla produkce etylenu v porovnání s neošetřenými (DMSO) listy o 25 % vyšší.



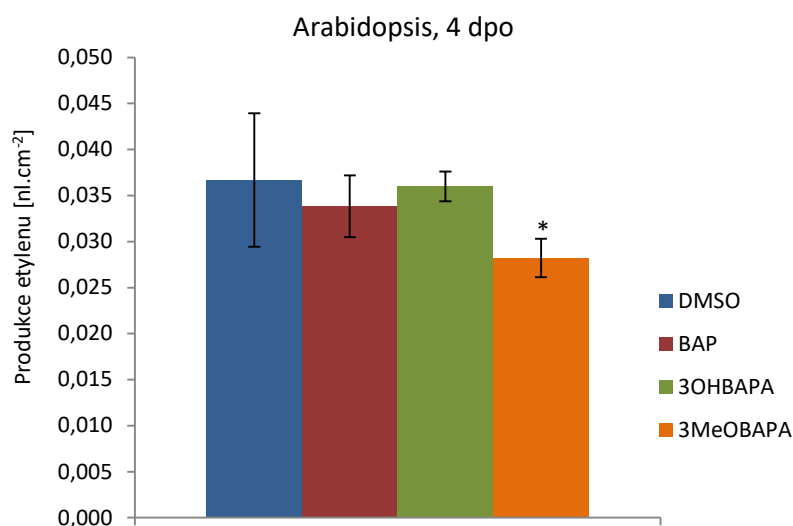
Obr. 16 Produkce etylenu oddělenými segmenty listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. V grafu jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty a chybové úsečky, které značí směrodatnou odchylku, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

Množství etylenu v oddělených listech *Arabidopsis* naměřené 6. dpo bylo u všech variant srovnatelné (Obr. 17).



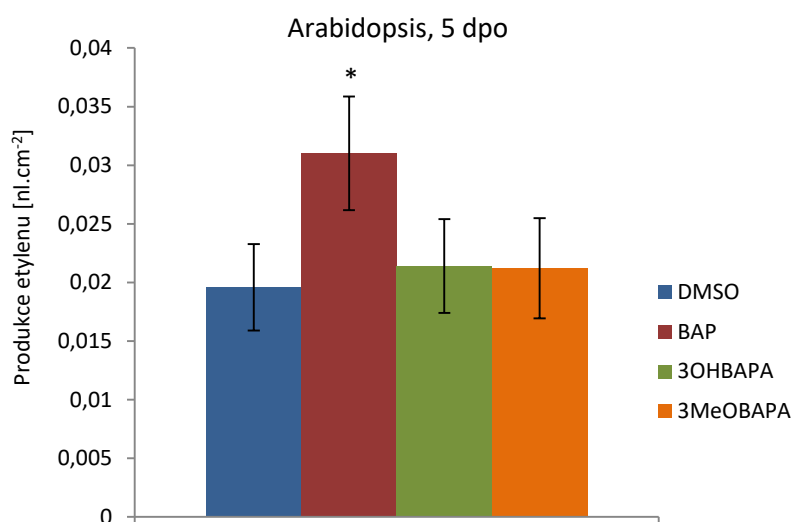
Obr. 17 Produkce etylenu oddělenými listy *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0), 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. V grafu jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty a chybové úsečky, které značí směrodatnou odchylku, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

Rozdíly v množství etylenu naměřené 4. dpo u listů *Arabidopsis* inkubovaných v DMSO, BAP a 3OHBAPA byly statisticky nevýznamné (Obr. 18). Ošetření oddělených listů 3MeOBAPA mělo za následek nižší produkci etylenu v porovnání s neošetřenými (DMSO) listy o přibližně 25 %.



Obr. 18 Produkce etylenu oddělenými listy *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0), 4. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. V grafu jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty a chybové úsečky, které značí směrodatnou odchylku, n = 5. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

U oddělených listů *Arabidopsis*, které byly ošetřeny BAP, bylo 5. dpo naměřeno o 60 % více etylenu než u neošetřených (DMSO) listů (Obr. 19). Při inkubaci listů v roztocích 3OHBAPA a 3MeOBAPA bylo množství produkovaného etylenu srovnatelné s neošetřenými (DMSO) listy.



Obr. 19 Obsah etylenu produkovaného oddělenými listy *Arabidopsis* (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0), které byly měřeny 5. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od něj odvozených nově připravených derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. V grafu jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty a chybové úsečky, které značí směrodatnou odchylku, n = 6. * značí statisticky významný rozdíl mezi použitými látkami a DMSO, $P < 0,05$.

5 Diskuze

Senescence je v rostlinách spojena s řadou změn, ke kterým patří pokles obsahu chlorofylů i dalších pigmentů, např. karotenoidů (Biswal 1995). Postupně dochází ke snížení rychlosti fotosyntézy a degradaci chloroplastů a dalších organel (Hensel *et al.*, 1993; Gan a Amasino, 1997; Ougham *et al.*, 2005). Změny ve fotosyntéze lze pozorovat např. změnami parametrů chlorofylové fluorescence jako je maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m), který v průběhu senescence klesá (Špundová *et al.*, 2003). V této práci byl sledován vliv nově připravených derivátů CK na obsah chlorofylu $a+b$ a karotenoidů, dále na parametr chlorofylové fluorescence (F_v/F_m) a na produkci etylenu během indukované senescence. Jako kontrolní roztok byl použit 0,1% DMSO, který se používá pro přípravu roztoků cytokininů.

Na základě výsledků předběžných experimentů bylo testování účinků látek prováděno šestý den po oddělení (dpo) u listů pšenice i *Arabidopsis*. V oddělených listech *Arabidopsis* však byla po 6 dpo pravděpodobně vlivem produkovaného etylenu v uzavřené vialce senescence natolik pokročilá, že nebylo možné objektivně zhodnotit působení použitých látek. Následující experimenty byly proto provedeny se čtyřdenní inkubací listů v roztocích, nicméně bylo zjištěno, že po této době ještě nedošlo k dostatečnému rozvoji senescence, aby se projevil vliv použitých látek na její oddálení a produkci etylenu. Z těchto důvodů bylo měření provedeno po 5 dnech inkubace oddělených listů v příslušných roztocích.

Cytokininům a jejich antisenesescenční aktivitě v rostlinách se věnovala řada autorů (např. Smart *et al.*, 1991; Gan a Amasino, 1995; Holub *et al.*, 1998; Selivankina *et al.*, 2001; Špundová *et al.*, 2003; Vlčková *et al.*, 2006; Mik *et al.*, 2011). Vlčková *et al.* (2006) studovali změny spojené se senescencí po exogenní aplikaci *meta*-topolinu na oddělené listy pšenice. Oddálení senescence poté pozorovali např. jako zpomalení degradace chlorofylů $a+b$, pomalejší nárůst lipidové peroxidace nebo mírnější pokles parametru fotosyntetické funkce F_v/F_m (Vlčková *et al.*, 2006). Obdobné výsledky byly získány i v této bakalářské práci, kdy v porovnání s DMSO byl po exogenní aplikaci BAP na oddělené listy pšenice i *Arabidopsis* udržen vyšší obsah chlorofylů a byl také zaznamenán pozitivní vliv na udržení F_v/F_m . Antisenesescenční účinek CK je z literatury tedy velmi dobře znám, nicméně celá řada studií zabývajících se zejména vztahem struktury a biologické aktivity látek odvozených od CK uvádí, že některé CK deriváty vykazují silnější antisenesescenční aktivitu než samotné CK. Vylíčilová *et al.* (2016)

pozorovali po čtyřdenní inkubaci oddělených listů pšenice v nově připravených C2-substituovaných aromatických CK derivátech v porovnání s BAP větší vliv některých derivátů na oddálení senescence. Nejúčinněji působily monosubstituované deriváty, které měly na benzenovém kruhu navázán atom fluoru, a to nezávisle na pozici navázání. Významný účinek také měly deriváty nesoucí atom chloru či bromu v pozici *meta*- či *para*-. Deriváty, které ve své chemické struktuře obsahovaly atom bromu či více atomů halogenů zároveň, byly obecně méně aktivní než BAP (Vylíčilová *et al.*, 2016). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími poznatky Holuba *et al.* (1998), který uvádí, že některé deriváty CK, které nesou v substituci hydroxy- skupinu, mohou zvýšit antisenescenční účinek daného derivátu (Holub *et al.*, 1998) a také Doležala *et al.* (2007), který říká, že hydroxylované deriváty a monomethoxyderiváty mohou vykazovat významnou aktivitu (Doležal *et al.*, 2007). V této bakalářské práci vykazoval u pšenice v porovnání s BAP vyšší antisenescenční aktivitu hydroxy- derivát BAP (3OHBAPA). Po exogenní aplikaci tohoto derivátu na oddělené listové segmenty došlo k udržení vyššího obsahu chlorofylů *a+b* a také vyššího F_v/F_m . V případě *Arabidopsis* byl udržen vyšší obsah chlorofylů po ošetření oddělených listů roztokem BAP, ale díky 3MeOBAPA došlo v porovnání s ostatními roztoky k udržení vyššího F_v/F_m . Oba tyto výsledky nejsou v rozporu s předchozími poznatky Doležala *et al.* (2007).

Z literatury, která se zabývá interakcemi CK a ethylenu (např. Kao a Yang, 1983; Cary *et al.*, 1995) je známo, že BAP dokáže oddálit senescenci, ale zároveň stimulovat biosyntézu etylenu, který naopak stárnutí listů i celé rostliny podporuje (Cary *et al.*, 1995). Kao a Yang (1983) uvádí, že po exogenní aplikaci BAP na oddělené listy pšenice dochází při uchování listů ve tmě k výrazně rychlejší degradaci chlorofylu a také vyšší produkci etylenu. Vyjadřují hypotézu, podle které má BAP vliv na oddálení senescence a zároveň také na produkci etylenu, při delším působení však klesá citlivost listů k produkovanému etylenu, čímž je umožněn antisenescenční účinek BAP (Kao a Yang, 1983). Výsledky této bakalářské práce jsou v souladu s těmito poznatky, jelikož po aplikaci BAP na oddělené listy pšenice i *Arabidopsis* došlo v porovnání s neošetřenými (DMSO) listy k oddálení senescence (vyšší obsah chl *a+b*, vyšší F_v/F_m) i navzdory vyšší produkci etylenu. V oddělených listových segmentech pšenice byla zaznamenána výrazně nižší produkce etylenu po ošetření derivátem 3OHBAPA, zatímco v oddělených listech *Arabidopsis* byl rozdíl v produkci etylenu mezi jednotlivými použitými látkami pouze minimální. Méně etylenu však produkovaly listy ošetřené derivátem 3MeOBAPA. Na základě těchto výsledků se domníváme, že

jedním z možných důvodů rozdílného působení použitých látek na oddálení senescence v oddělených listech a listových segmentech modelových rostlin je jejich rozdílná produkce etylenu. Vyšší produkce etylenu vlivem působení BAP může být důvodem pro jeho nižší antisenescenční účinek v porovnání s nově připravenými deriváty 3OHBAPA u pšenice a 3MeOBAPA u Arabidopsis. Tato problematika vyžaduje další podrobnější testování a experimenty, které jsou však nad rámec této bakalářské práce.

6 Závěr

Cytokinininy ovlivňují v rostlinných organismech řadu biologických procesů. Mezi nejvýznamnější účinky patří jejich schopnost oddálit nebo zpomalit senescenci. Tato antisenescenční aktivita byla zaznamenána u přirozeně se vyskytujících i syntetických cytokininů, ale také u celé řady derivátů od nich odvozených. Navzdory jejich působení na oddálení senescence některé cytokinininy zároveň podporují produkci etylenu, který naopak senescenci urychluje. Přesný mechanismus účinku cytokininů na produkci etylenu nebyl zatím zcela objasněn. V této práci byly porovnávány účinky dvou nově připravených cytokininových derivátů s označením 3OHBAPA a 3MeOBAPA, které byly odvozeny od aromatického cytokininu 6-benzylaminopurinu (BAP). Působení BAP a jeho derivátů o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ na oddálení změn spojených se senescencí (obsah chlorofylů *a+b* a karotenoidů, parametr F_v/F_m) a produkci etylenu bylo srovnáváno po jejich exogenní aplikaci na modelové rostliny - pšenici jarní (*Triticum aestivum* L., cv. Aranka) a Arabidopsis (*A. thaliana* L., ekotyp Columbia 0). BAP i jeho deriváty měly prokazatelný vliv na oddálení sledovaných změn způsobených indukovanou senescencí. Zároveň bylo zjištěno, že testované deriváty 3OHBAPA a 3MeOBAPA působí odlišně u jednotlivých použitých rostlin. U pšenice byla senescence nejúčinněji oddálena působením derivátu 3OHBAPA, a to ve všech sledovaných parametrech. Zároveň listové segmenty ošetřené tímto derivátem produkovaly výrazně nižší množství etylenu než v případě inkubace segmentů v BAP. U Arabidopsis byl zaznamenán naopak silnější antisenescenční účinek derivátu 3MeOBAPA. Zatímco obsah chlorofylů *a+b* se u listů ošetřených 3MeOBAPA a BAP lišil jen mírně, fotosyntetická aktivita (F_v/F_m) byla vlivem 3MeOBAPA přibližně o 10 % vyšší. Produkce etylenu byla u listů inkubovaných v BAP výrazně vyšší než v případě všech ostatních použitých látek. Jednou z příčin rozdílného působení testovaných látek by mohla být právě různá produkce etylenu rostlinami po aplikaci těchto sloučenin.

7 Literatura

- Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E.Jr. (1992): *Ethylene in Plant Biology*. 2nd ed. Academic Press, New York, U.S.A., 414 stran.
- Badenoch-Jones J., Parker C.W., Letham D.S., Singh S. (1996): Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and beat. *Plant, Cell and Environment* **19**, 504–516.
- Biswal B. (1995): Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Phytochemistry and Photobiology B* **30**, 3-13.
- Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C., Kiddle S., Kim Y.S., Penfold C.A., Jenkins D., Zhang C., Morris K., Jenner C., Jackson S., Thomas B., Tabrett A., Lefaie R., Moore J.D., Wild D.L., Ott S., Rand D., Beynon J., Denby K., Mead A., Buchanan-Wolaston V. (2011): High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* **23**, 873-894.
- Çağ S., Palavan-Ünsal N., Büyüktuncer D. (2003): Comparison of the effects of *meta*-topolin and other cytokinins on chlorophyll and protein contents and peroxidase activity in cucumber cotyledons. *Israel Journal of Plant Sciences* **51**, 261-265.
- Cary A., Liu W., Howell S. (1995): Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **106**, 1075-1082.
- Clausen S., Apel K. (1991): Seasonal changes in the concentration of the major storage proteins and its mRNA in xylem ray cells of poplartrees. *Plant Molecular Biology* **17**, 669-678.
- Cohen J.D., Slovin J.P., Hendrickson A.M. (2003): Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* **8**, 197-199.
- Curaba J., Singh M.B., Bhalla P.L. (2014): miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1425-1438.
- Dertinger U., Schaz U., Schulze E.D. (2003): Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum* **119**, 19-29.
- Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P., Thorpe T.A. (1981): Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxidisedismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* **32**, 93-101.
- Doležal K., Popa I., Hauserová E., Spíchal L., Chakrabarty K., Novák O., Kryštof V., Voller J., Holub J., Strnad M. (2007): Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N⁶-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 3737-3747.
- Drake R., John I., Farrell A., Cooper W., Schuch W., Grierson D. (1996): Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**, 755-767.
- Duranni F., Subhan M., Mehmood S., Abbas S., Chaudhary F., Sarhad J. (2010): Enhancement of growth and yield components through foliar application of naphthalene acetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) in spinach. *Sarhad Journal of Agriculture* **26**, 31-36.

- Elfving D.C., Cline R. (1993): Benzyladenine and other chemicals for thinning 'Empire' apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **118**, 593-598.
- El-Showk S., Ruonala R., Helariutta Y. (2013): Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**, 1373-1383.
- Ewers F.W., Schmid R. (1981): Longevity of needle fascicles of *Pinus longaeva* (Bristlecone pine) and other North American pines. *Oecologia* **51**(1), 107-115
<http://link.springer.com/10.1007/BF00344660>.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- Gan S., Amasino R.M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Gan S., Amasino R.M. (1996): Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bio Essays* **18**, 557-565.
- Gan S., Amasino R.M. (1997): Making sense of senescence. *Plant Physiology* **113**, 313-319.
- Genkov T., Tsoneva P., Ivanova I. (1997): Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **16**, 169-172.
- Grbić V., Bleecker A.B. (1995): Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal* **8**, 595-602.
- Grover A, Mohanty P. (1992): Leaf senescence-induced alterations in structure and function of higher plants chloroplasts. *Photosynthesis: photoreactions to plant productivity* (Abrol Y.P., Mohanty P., Govindjee, eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 226-234.
- Guo Y., Gan S.S. (2012): Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant Cell Environment* **35**, 644-655.
- Haroun S.A., Shukry W.M., Abbas M.A., Mowafy A.M. (2011): Growth and physiological responses of *Solanum lycopersicum* to atonik and benzyl adenine under vernalized conditions. *Journal of Ecology and Natural Environment* **3**, 319-331.
- He P., Jin J.Y. (1999): Relationships among hormone changes, transmembrane flux of Ca²⁺ and lipid peroxidation during leaf senescing in spring maize. *Acta Botanica Sinica* **41**, 1221-1225.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D.F., Gan S. (2002): Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiology* **128**, 876-884.
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B. (1993): Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell* **5**, 553-564.
- Holub L., Hanuš J., Hanke D.E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *Ortho*- and *Meta*-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.
- Hwang I., Sheen J., Muller B. (2012): Cytokinin signaling network. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 353-380.

- Chao M., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi Q., Ecker J.R. (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE-3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133-1144.
- Chernyad'ev I.I., Monakhova O.F. (2003): Effect of cytokinin preparations on the pools of pigments and proteins of bean cultivars differing in their tolerance to water stress. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**, 524-531.
- Chory J., Reinecke D., Sim S., Washburn T. a Brenner M. (1994): A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis (det mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology* **104**, 339-347.
- Jensen M.K., Kjaersga T., Nielsen M.M., Galberg P., Petersen K., O'Shea C., Skriver K. (2010): The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* **426**, 183-196.
- Jing H.C., Schippers J.H., Hille J., Dijkwel P.P. (2005): Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and OLD genes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2915-2923.
- Johnson P.R., Ecker J.R. (1998): The ethylene gas signal transduction pathway: A Molecular perspective. *Annual review of Genetics* **32**, 227-254.
- Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G.M., Pot C.S., de Visser R., van Rhijn J.A., Gan S., Amasino R.M. (2000): Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-*IPT* tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment* **23**, 279-289.
- Kalaji H.M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Ferroni L., Goltsev V., Guidi L., Jajoo A., Li P., Losciale P., Mishra V.K., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Pollastrini M., Suresh K., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M., Cetner M., Samborska I.A., Stirbet A., Olsovska K., Kunderlikova K., Shelonzek H., Rusinowski S., Bąba W. (2017): Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research* **132**, 13-66.
- Kamínek M., Vaněk T., Motyka V.J. (1987): Cytokinin activities of N⁶-nebzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation* **6**, 113-120.
- Kao C.H. (1980): Senescence of rice leaves IV. Influence of benzyladenine on chlorophyll degradation. *Plant and Cell Physiology* **21**, 1255-1262.
- Kao C.H., Yang S.F. (1983): Role of ethylene in the senescence of detached rice leaves. *Plant Physiology* **73**, 881-885.
- Kelley D.R., Estelle M. (2012): Ubiquitin-mediated control of plant hormone signalling. *Plant Physiology* **160**, 47-55.
- Khan M., Rozhon W., Poppenberger B. (2014): The role of hormones in the aging of plants-a mini review. *Gerontology* **60**, 49-55.
- Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R. (1993): CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *The Cell* **72**, 427-441.

- Koprna R., De Diego N., Dundálková L., Spíchal L. (2016): Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**, 484-492.
- Kou X., Watkins C.B., Gan S.S. (2012): Arabidopsis AtNAP regulates fruit senescence. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6139-6147.
- Langer R.H.M., Prasad P.C., Laude H.M. (1973): Effects of kinetin on tiller bud elongation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany* **37**, 565-571.
- Lee S., Seo P.J., Lee H.J., Park C.M. (2012): A NAC transcription factor ntl4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **70**, 831-844.
- Leshem Y.Y. (1988): Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine* **5**, 39-49.
- Letham D.S., Miller C.O. (1965): Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant and cell Physiology* **6**, 355-359.
- Li J., Li Z., Tang L., Yang Y., Zouine M., Bouzayen M. (2017): A conserved phosphorylation site regulates the transcriptional function of ETHYLENE-INSENSITIVE 3-like1 in tomato. *Journal of Experimental Botany* **63**, 427-439.
- Lichtenthaler H.K. (1987): Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G. (2007): Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136.
- Lin Y.J., Cao M.L., Xu C.G., Chen H., Wei J., Zhang Q.F. (2002): Cultivating rice with delaying leaf-senescence by PSAG12-IPT gene transformation. *Acta Botanica Sinica* **44**, 1333-1338.
- Liu Y.D., Yin Z.J., Yu J.W., Li J., Wei H.L., Han X.L., Shen F.F. (2012): Improved salt tolerance and delayed leaf senescence in transgenic cotton expressing the *Agrobacterium IPT* gene. *Biologia Plantarum* **56**, 237-246.
- Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M. (1994): Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**, 322-328.
- Malik M.N.A., Din S., Makhdam M.I., Chaudhry F.I. (2002): Use of thidiazuron as harvest-aid in e. *International Journal of Agriculture and Biology* **4**, 71-73.
- Mattoo A., Suttle J.C. (1991): *The plant hormone ethylene*. CRC Press, BocaRaton, Florida, U.S.A, 337 stran.
- Mik V., Szüčová L., Šmehilová M., Zatloukal M., Doležal K., Nisler J., Grúz J., Galuszka P., Strnad M., Spíchal L. (2011): N⁹-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* **72**, 821-831.
- Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of American Chemical society* **77**, 1392.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001): Cytokinin degradation and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Mok M.C., Martin R.C., Dobrev P.I., Vaňková R., Shing Ho P., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D.W.S. (2005): Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives

- are substrates of cytokinin *O*-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiology* **137**, 1057-1066.
- Morris K., MacKerness S.A., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Buchanan-Wollaston V. (2000): Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* **23**, 677-685.
- Munné-Bosch S. (2008): Do perennials really senesce? *Trends in Plant Science* **13**, 216-220.
- Nam H.G. (1997): The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 200-207.
- Noh Y., Amasino R.M. (1999): Identification of a promotor region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology* **41**, 181-194.
- Noodén L.D., Leopold A.C. (1978): Phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission. In *Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise* (Letham D.S., Goodwin P.B. and Higgins T.J.V., eds.) Elsevier, New York, U.S.A., 329-369.
- Noodén L.D., Guiamet J.J., John I. (1997): Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.
- Noodén L.D., Hilsberg J.W., Schneider M.J. (1997): Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiologia Plantarum* **96**, 491-495.
- Ougham H.J., Morris P., Thomas H. (2005): The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Current Topics in Developmental Biology* **66**, 135-160.
- Prokopová J., Špundová M., Sedlářová M., Husičková A., Novotný R., Doležal K., Nauš J., Lebeda A. (2010): Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 716-723.
- Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000): Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**, 278-282.
- Ray S., Mondal W.A., Choudhuri M.A. (1983): Regulation of leaf senescence, grain filling and yield of rice by kinetin and abscisic acid. *Physiologia Plantarum* **59**, 343-346.
- Reinbothe C., Springer A., Samol I., Reinbothe S. (2009): Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *The FEBS Journal* **276**, 4666-4681.
- Roháček K. (2002): Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* **40**, 13-29.
- Roháček K., Barták M. (1999): Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* **37**, 339-363.
- Rosenvasser S., Mayak S., Friedman H. (2006): Increase in reactive oxygen species (ROS) and senescence-associated gene transcript (*SAG*) levels during dark-induced senescence of *Pelargonium* cuttings, and the effect of gibberellic acid. *Plant Science* **170**, 873-879.
- Rulcová J., Pospíšilová J. (2001): Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biologia Plantarum* **44**, 75-81.

- Ryu S., Wang X. (1995): Expression of phospholipase D during castorbean leaf senescence. *Plant Physiology* **108**, 713-719.
- Selivankina S.Y., Karavaiko N.N., Kuiper D., Novikova G.V., Kulaeva O.N. (2001): Cytokinin activity of zeatin allylic phosphate, a natural compound. *Plant Growth Regulation* **33**, 157-164.
- Smart C.M. (1994): Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.
- Špundová M., Popelková H., Ilík P., Skotnica J., Novotný R., Nauš J. (2003): Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescencing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1051-1058.
- Taylor C.B., Bariola P.A., Delcardayre S.B., Raines R.T., Green P.J. (1993): RNSZ: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 5118-5122.
- Thompson B.G., Lake B.H. (1987): The effect of radiation on the long term productivity of a plant based CELLS. *Advances in Space Research* **7**, 133-140.
- Ueda J., Kato J. (1980): Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* **66**, 246-249.
- Vlčková A., Špundová M., Kotabová E., Novotný R., Doležal K., Nauš J. (2006): Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* **126**, 257-267.
- Vogel J.P., Schuerman P., Woeste K., Brandstatter I., Kieber J.J. (1998): Isolation and characterisation of Arabidopsis mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* **149**, 417-427.
- Vylčilová H., Husičková A., Spíchal L., Srovnal J., Doležal K., Plíchal O., Plíhalová L. (2016): C2-substituted aromatic cytokinin sugar conjugates delay the onset of senescence by maintaining the activity of the photosynthetic apparatus. *Phytochemistry* **122**, 22-33.
- Watanabe A., Hamada K., Yokoi H. (1994): Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine synthetase genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. *Plant Molecular Biology* **26**, 1807-1817.
- Weaver L.M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M. (1998): A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**, 455-469.
- Woeste K.E., Vogel J.P., Kieber J.J. (1999): Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **105**, 478-484.
- Woo H.R., Kim H.J., Nam H.G., Lim P.O. (2013): Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science* **126**, 4823-4833.
- Yang S., Hoffman N. (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 155-189.
- Yaronskaya E., Vershilovskaya I., Poers Y., Alawady A.E., Averina N., Grimm B. (2006): Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* **224**, 700-709.

- Zacarias L., Reid M.S. (1990): Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum* **80**, 549-554.
- Zhang P., Wang W.Q., Zhang G.L., Kamínek M., Dobrev P, Xu J. (2010): Senescence-inducible expression of isopentenyltransferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 653-669.
- Zimmermann P., Zentgraf U. (2005): The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* **10**, 515-534.
- Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Selivankina S.Y., Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Kudryakova N.V, Zubkova N.K., Liere K., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V., Börner T. (2008): Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plant Physiology* **148**, 1082-1093.

8 Seznam použitých zkratek

3MeOBAPA	nově připravený derivát odvozený od 6-benzylaminopurinu
3OHBAPA	nově připravený derivát odvozený od 6-benzylaminopurinu
ABA	kyselina abscisová
BAP	6-benzylaminopurin
CK	cytokininy
CPPU	N-(2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenylmočovina
DMSO	dimethylsulfoxid
dpo	dny po oddělení
DPU	difenylmočovina
F ₀	minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _m	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _v /F _m	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
chl	chlorofyl
IAA	kyselina indolactová
JA	kyselina jasmonová
MeJA	metyljasmonát, volatilní ester kyseliny jasmonové (JA)
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , fotosynteticky aktivní záření
PCD	<i>programmed cell death</i> , programovaná buněčná smrt
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RNA	ribonukleová kyselina
SA	kyselina salicylová
SAG	<i>senescence-associated genes</i> , geny aktivované senescencí
TDZ	thidiazuron, N-fenyl-N'-(1,2,3-rh diazol-5-yl)močovina
tZ	<i>trans</i> -zeatin